

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Pediatría



**EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL,
SECRETADO POR CÉLULAS TRANSDUCIDAS, EN LA
REGENERACIÓN NERVIOSA PERIFÉRICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena M^a Jiménez García

Bajo la dirección de los doctores
María Ángeles Muñoz Fernández
José María Lasso Vázquez

Madrid, 2011

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría

Tesis Doctoral



Efecto del factor de crecimiento endotelial, secretado por
células transducidas, en la regeneración nerviosa periférica

Elena M^a Jiménez García
Madrid, Noviembre de 2010

Todo hombre puede ser, si quiere, escultor de su propio
cerebro

Santiago Ramon y Cajal

A mi familia, que preparó el camino
A mi marido por su cariño y comprensión y amor
A mis hijas por su esperanza.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis María Angeles Muñoz Fernández y Jose María Lasso Vázquez por vuestro apoyo, magnífica enseñanza a lo largo del desarrollo de la tesis.

A Javier Palacín, veterinario del Animalario de la Universidad Autónoma por su ayuda inestimable en el proceso quirúrgico y cuidado de los animales, así como los eternos viernes por la tarde entre conejos.

A Marcela del Rio que me abrió las puertas de su laboratorio para poder acceder a las células transfectadas. Marta García que me ayudó en todo momento con el proceso de transfección de forma absolutamente desinteresada y me proporcionaba conejo a conejo los especímenes necesarios.

A Chusa que me ayudó con el conteo de las células y preparación final de los dispositivos previos para la creación del gel de fibrina.

A Raquel, que brujuleó hasta encontrar los anticuerpos y me preparó las tinciones en un suspiro.

A Santiago y Lola y sus artes con el SPSS y cómo transformarlos en tablas y cuadros de PDF.

Al doctor Salinero especialista en sistema nervioso del Servicio de Anatomía Patológica sin su apoyo y enseñanza esta tesis hubiera sido simplemente imposible. Muchas gracias por su paciencia y sus horas ante el microscopio.

A la doctora Pérez Cano, jefe del Servicio de Cirugía Plástica del Hospital Universitario Gregorio Marañón, por su apoyo para alcanzar el final y su inquebrantable fe en mí.

A mis compañeros de servicio, Alfonso, Ignacio, Lourdes, Marta, Nerea, Teresa por su compañía durante estos años escuchando anécdotas y dando ánimos.

Por su puesto a mi compañero y marido Juan. Gracias infinitas por su apoyo, confianza, comprensión, cariño incondicional y amor.

Efecto del factor de crecimiento endotelial, secretado por células transducidas, en la regeneración nerviosa periférica

TESIS DOCTORAL
Elena Jiménez García
Madrid, 2010

Directores:

Dr. José María Laso Vázquez
Dra. María Angeles Muñoz Fernández



Elena Jiménez García

Índice

Contenido

1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	La regeneración en nervios periféricos y la terapia génica	2
1.2	Antecedentes históricos de la reparación nerviosa	3
1.3	Anatomía	4
1.3.1	Clasificación de las lesiones nerviosas	6
1.3.2	Fisiopatología de la degeneración nerviosa	7
1.3.3	Fisiología de la regeneración nerviosa	9
1.4	Estrategias para mejorar los resultados en la regeneración del nervio periférico.....	12
1.4.1	Farmacológica	12
1.4.2	Factores tróficos	12
1.4.3	Tubos Guía.....	13
1.5	Ingeniería Tisular.....	13
1.5.1	Bases de la terapia génica	13
1.5.2	Transducción	14
1.6	El concepto de canal guía nervioso	16
1.6.1	Materiales biocompatibles como canales guía	18
1.6.2	Materiales sintéticos como canales guía	19
1.6.3	Propiedades físicas de los canales guía.....	20
1.6.4	Propiedades biológicas e interactivas de los canales guía.....	21
1.6.5	El factor de crecimiento endotelial	23
2	HIPÓTESIS	27
2.1	Hipótesis	27
2.2	Objetivos	27
3	MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1	Materiales	29
3.1.1	Instalaciones	29
3.1.2	Animal de Experimentación.....	29
3.1.3	Protocolo Experimental.....	30
3.1.4	Material Quirúrgico.....	31
3.2	Metodología	31
3.2.1	Confección de los grupos de estudio.....	31
3.2.2	Intervenciones quirúrgicas	32
3.2.3	Método de cultivo celular	33
3.2.4	Preparación de los geles de fibrina.....	33
3.2.5	Manejo del animal de experimentación	34
3.2.6	Métodos de valoración.....	40
4	RESULTADOS	43
4.1	Comportamiento neurológico.....	43
4.2	Valoración clínico quirúrgica	43
4.2.1	Grupo I	44
4.2.2	Grupo II.....	45
4.2.3	Grupo III	46
4.3	Valoración técnicas de Anatomía Patológica	48
4.3.1	Tinción de hematoxilina/eosina	48
4.3.2	Detección de Neurofilamentos.....	52
4.3.3	Detección del factor de crecimiento endotelial (VEGF)	57
4.4	Valoración técnicas de Estadística	60
5	DISCUSIÓN.....	67
6	CONCLUSIONES.....	78
7	BIBLIOGRAFÍA	80

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Diversos tipos de suturas nerviosa como son la sutura epineural y.....	4
Ilustración 2 Corte histológico de un nervio periférico.....	5
Ilustración 3 Conejo raza New Zealand.....	30
Ilustración 4 Exposición de la fase de toma del fragmento venoso.	35
Ilustración 5 Disposición de la anatomía de los nervio tibial y peroneo	36
Ilustración 6 Especimen con sutura nerviosa	36
Ilustración 7. Especimen con vena interpuesta y relleno con fibrina	37
Ilustración 8. Especimen con interposición de vena	37
Ilustración 9. Especimen Grupo I Subgrupo 7 días	44
Ilustración 10. Especimen Grupo I subgrupo 21 días.....	44
Ilustración 11. Especimen Grupo II Subgrupo 7 días	45
Ilustración 12. Especimen Grupo II subgrupo 21 días.....	45
Ilustración 13. Especimen Grupo III 7 días	46
Ilustración 14. Especimen Grupo III subgrupo 21 días	47
Ilustración 15. Especimen Grupo III Subgrupo 80 días.....	47
Ilustración 16. Especimen Grupo I subgrupo 7 días teñido con hematoxilina eosina.....	48
Ilustración 17. Especimen Grupo I subgrupo 21 días	49
Ilustración 18. Especimen Grupo II subgrupo 7 días.....	50
Ilustración 19. Especimen Grupo II subgrupo 21 días.....	50
Ilustración 20. Especimen Grupo III subgrupo 7 días	51
Ilustración 21. Especimen Grupo III subgrupo 21 días	52
Ilustración 22. Especimen Grupo I 7 días.....	53
Ilustración 23. Especimen Grupo I 7 días.....	53
Ilustración 24. Especimen Grupo I 21 días.....	53
Ilustración 25. Especimen Grupo I 21 días.....	53
Ilustración 26. Especimen grupo II 7 días	54
Ilustración 27. Especimen Grupo II 21 días extremo proximal	54
Ilustración 28. Especimen Grupo II 21 días extremo distal.....	54
Ilustración 29. Especimen Grupo II 80 días extremo proximal	55
Ilustración 30. Especimen Grupo III 21 días extremo proximal	56
Ilustración 31. Especimen Grupo III 21 días extremo distal	56
Ilustración 32. Especimen Grupo III 80 días	56
Ilustración 33. Especimen Grupo I 7 días.....	57
Ilustración 34. Especimen Grupo I 21 días.....	57
Ilustración 35. Especimen Grupo II 7 días	58
Ilustración 36 A y B . Especimen Grupo II 21 días extremo proximal (A), extremo distal (B)	58
Ilustración 37. Especimen Grupo III 7 días VEGF.....	59
Ilustración 38. Especimen Grupo III 21 días VEGF.....	59
Ilustración 39. Especimen Grupo III 21 días VEGF.....	59
Ilustración 40. Resultados de promedios distales en el Grupo 1	60
Ilustración 41. Resultados de los promedios distales y proximales en los especímenes del Grupo 2.....	61
Ilustración 42. Resultados correspondientes al Grupo 3.....	62
Ilustración 43. Resultados comparativos entre los promedios proximales de los tres grupos en el intervalo de tiempo correspondiente a 7 días.	62
Ilustración 44. Resultados comparativos entre los promedios distales de los tres grupos en el intervalo de tiempo correspondiente a 21 días.	63
Ilustración 45. Resultados comparativos de los promedios proximales correspondientes al intervalo de 80 días.	63
Ilustración 46. Resultado de los promedios distales correspondientes al intervalo de 7 días.....	64
Ilustración 47. Resultados de los promedios distales correspondientes al intervalo de 21 días.	64
Ilustración 48. Resultados de los promedios distales correspondientes al intervalo de 80 días.	65

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La regeneración en nervios periféricos y la terapia génica

Las lesiones nerviosas forman parte de una patología clínica muy frecuente que alcanza tasas del 5% en las heridas abiertas de extremidades y que habitualmente no se suelen abordar en profundidad, en el manejo quirúrgico por los resultados poco alentadores que se obtienen. Suelen ser secundarias a traumatismos en accidentes, especialmente de tráfico o deportivos, y con un rango de lesión muy variable incluyendo desde lesiones a nivel metabólico en la neurita, hasta alteraciones a nivel macroscópico con interrupción completa de la anatomía nerviosa. Las secuelas son también muy variables, alcanzando en algunos casos tasas de discapacidad muy importantes, con los recargos correspondientes de invalidez parcial o total.

En el campo de los trasplantes como la mano, la regeneración nerviosa es la frontera biológica que disminuye la capacidad funcional de la mano trasplantada y que limita las perspectivas de éxito de este campo médico.

En los últimos años el conocimiento de los factores que intervienen en la regeneración nerviosa se ha enriquecido con aspectos de ingeniería genética como la aplicación de células madre, el perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas y equipos tecnológicos de última generación. Aún así, las respuestas positivas son escasas y con resultados finales poco predecibles, de modo que se impone la búsqueda de nuevas soluciones regeneradoras.

Mediante la terapia génica podemos actuar modulando la función celular o cambiando la estructura a nivel molecular, de modo que se podrían obtener resultados para aplicaciones clínicas directas como son el tratamiento de enfermedades congénitas, errores del metabolismo o incluso corrección de enfermedades adquiridas. En el momento actual el tratamiento de estas patologías se basa principalmente en un cambio en los hábitos de vida de los pacientes, con las consiguientes limitaciones vitales y morbilidad asociada. Ejemplo de ello son las inyecciones diarias de insulina, la abstención en la toma de ciertos alimentos en la fenilcetonuria o en la celiacía.

La ingeniería genética se presenta como una alternativa al tratamiento definitivo y perdurable en el tiempo para estas patologías. En este sentido el

futuro se perfila en dos caminos, tanto la reposición de los elementos perdidos como la mejora de la regeneración de elementos dañados.

1.2 Antecedentes históricos de la reparación nerviosa

A lo largo del siglo XIX se desarrolló el debate sobre la regeneración nerviosa con dos corrientes médicas principales; los monogenistas, apoyados por Waller¹, que defendían que después de una sección nerviosa los axones del segmento proximal seguían conectados al cuerpo neuronal y por ello permanecían viables, mientras los del segmento distal degeneraban; y los poligenistas que por el contrario consideraban que eran los axones distales los que permanecían y que posteriormente se reanastomosaban con el segmento proximal.

Las primeras técnicas quirúrgicas de reparación nerviosa fueron descritas en 1871 por Hueter² que consiguió la unión de dos cabos nerviosos mediante la colocación de suturas en el epineuro. Esta técnica se considera la forma clásica de realizar una reparación nerviosa y tiene actualmente máximo vigor en la práctica clínica. Dos características que son básicas para obtener un resultado óptimo son la alineación correcta de las fibras nerviosas y la existencia de mínima tensión en el punto de coaptación. El contenido intraneural debe permanecer intacto y en los límites del epineuro, para generar la menor fibrosis posible y no abocar en un tejido cicatricial que impida la regeneración deseada.

Sin embargo, si los fascículos quedan desorientados, se genera una mala alineación en el sitio de coaptación, y el resultado final puede originar un fallo de calidad regenerativa en el que aunque exista continuidad nerviosa, la información de fibras estaría mezclada y no corresponde a la expresión cerebral de dicha zona anatómica.

La sutura perineural se presentó en 1967 por Bora que realizó bajo el microscopio la alineación del perineuro de los fascículos. La mayor desventaja de esta técnica es la presencia de material extraño intraneural y la fibrosis asociada que se establece como un obstáculo al avance de la regeneración.

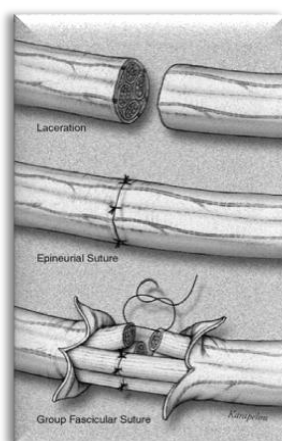


Ilustración 1. Diversos tipos de suturas nerviosas como son la sutura epineural y la sutura de grupos fasciculares.

En los supuestos en que la distancia entre ambos cabos nerviosos es amplia se precisa recurrir al empleo de un injerto nervioso no vascularizado que cumpla la función de canal guía nervioso. Actualmente en la práctica clínica se recurre al nervio sural como zona donante. Aunque no existe un dato establecido respecto a la longitud máxima que se puede injertar, se han conseguido resultados satisfactorios en longitudes de 7 cm. Si ésta distancia es superior se produce un proceso de fibrosis y degeneración fascicular por apoptosis metabólica celular.

Por último, el concepto de vascularización nerviosa introducido por Taylor y Ham^{3,4} enfoca un campo de reconstrucción nerviosa en casos especialmente complicados en los cuales se precisa injertar distancias mayores. El cabo nervioso se trasplanta con vascularización incluida para evitar la degeneración metabólica. Esta nueva opción quirúrgica aunque soluciona la muerte celular, asocia desventajas como son la dificultad técnica asociada, la morbilidad de la zona donante y los límites anatómicos para obtener el injerto nervioso vascularizado. Dependiendo de estos parámetros su aplicación se limita en función de los pacientes y las patologías.

1.3 Anatomía

El nervio periférico está constituido por fibras nerviosas agrupadas en fascículos (funículos). Cada fascículo está compuesto predominantemente por fibras nerviosas motoras, sensitivas o simpáticas, aunque todas ellas pueden estar mezcladas en un mismo fascículo.

Cada fibra nerviosa o axón está rodeada por una lámina de tejido conectivo denominada endoneuro cuya función es la protección y nutrición de los axones. Los fascículos están rodeados, uno por uno, por una lámina de tejido conectivo definida como perineuro y que contribuye a la fuerza tensil del nervio. Los grupos fasciculares se agrupan por tejido areolar laxo, denominado epineuro, que los nutre y protege. El tronco nervioso constituido por numerosos fascículos presenta una movilidad considerable dentro del epineuro. La proporción entre tejido nervioso y tejido conectivo varía según el tipo de nervio y la localización. El tejido conectivo entre los fascículos se denomina tejido interfascicular, siendo una prolongación del epineuro.

Los fascículos se van ramificando y anastomosando entre ellos formando un plexo nervioso intraneural que implica continuas variaciones de la topografía fascicular. Dichas interconexiones son frecuentes en los segmentos proximales e infrecuentes en los distales, permitiendo una disección interfascicular en los segmentos nerviosos distales sin lesionar las fibras nerviosas. En la reparación nerviosa es importante respetar dicha distribución fascicular para obtener un buen resultado.

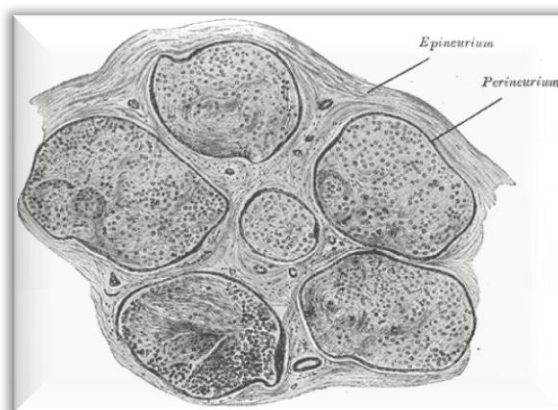


Ilustración 2 Corte histológico de un nervio periférico

El aporte vascular lo constituye un plexo vascular complejo, compuesto por dos sistemas arteriales, uno extrínseco y otro intrínseco anastomosados entre sí. El sistema extrínseco se localiza en la superficie del nervio y mantiene una posición relativamente constante a lo largo de toda la longitud del nervio. Aporta de forma mesoneural un número de arterias nutricias que varían en tamaño y número y penetran en el nervio a intervalos irregulares. Dichas ramas nutricias se ramifican repetidamente y se anastomosan con el sistema arterial

intrínseco, localizado longitudinalmente en todas las láminas conectivas del nervio, para crear un sistema interconectado.

1.3.1 Clasificación de las lesiones nerviosas

La clasificación fue establecida por Seddon en 1943, ampliada por Sunderland en 1951 y mejorada por Mackinnon. Seddon ⁵ clasificó las lesiones nerviosas en tres grandes grupos: neuroapraxia, axonotmesis y neurotmesis.

Sunderland⁶ amplió la clasificación estableciéndola en base al pronóstico. Subdividió la axonotmesis de Seddon en tres grados, dependiendo del grado de lesión del componente conectivo del nervio.

- Tipo I: equivalente a la neuroapraxia. Se produce un bloqueo de la conducción nerviosa sin degeneración Walleriana. La recuperación funcional es completa transcurrido semanas o meses.
- Tipo II: el endoneuro y el perineuro anatómicamente se hallan intactos, pero los axones están fisiológicamente interrumpidos. La regeneración axonal está dirigida a lo largo de su recorrido original y por ello se puede esperar una recuperación funcional completa. El tiempo de recuperación depende del nivel de la lesión (generalmente meses), y de la llegada de los axones al tejido diana.
- Tipo III: el endoneuro está interrumpido, quedando íntegro el perineuro. La recuperación funcional es incompleta y en muchos casos se genera la siguiente situación clínica:
 - es una lesión retrógrada de los cuerpos celulares de mayor grado, que puede llegar a destruir la neurona o retrasar su recuperación.
 - aparece fibrosis interfascicular por presentar una lesión del endoneuro, lo que interfiere en la regeneración axonal.
 - mayor lapso de tiempo para inervar al órgano diana que ha podido sufrir cambios secundarios a la denervación que impidan una recuperación completa.
- Tipo IV: la integridad del nervio se debe a un tejido cicatricial que contiene los fascículos nerviosos interrumpidos. La degeneración retrógrada y la fibrosis interfascicular es más acusada, por lo que la

recuperación es mínima. Este grado precisa la resección del segmento lesionado y la reconstitución quirúrgica con un segmento nervioso.

- Tipo V: equivalente a la neurotmesis, disrupción fisiológica del nervio. La función nerviosa degenera de forma secuencial: motora, sensibilidad propioceptiva, tacto, temperatura, dolor y componente simpático y su recuperación nerviosa se refleja en sentido inverso. Dado que esta patología es concomitante con lesiones abiertas, siempre está indicada una exploración quirúrgica. La recuperación funcional espontánea no existe.

La clasificación de Sunderland representa una descripción anatómica de la lesión nerviosa, estando su utilidad clínica en debate. La mayoría de las lesiones no se pueden clasificar en un sólo grado y en la práctica clínica las lesiones mixtas son muy frecuentes a nivel de los nervios periféricos. Por ello Mackinnon⁷ ha descrito un VI grado de lesión nerviosa que integra los diferentes grados de Sunderland en un mismo segmento nervioso lesionado.

1.3.2 Fisiopatología de la degeneración nerviosa

Existen dos mecanismos básicos por los que se produce la eliminación de los axones lesionados: retracción y degeneración ⁸. Para el objetivo fundamental de esta Memoria nos referiremos fundamentalmente a la degeneración.

La degeneración nerviosa fue descrita por Waller en 1850 ⁹. Numerosos experimentos han establecido que la alteración es intrínseca a la sección axonal permitiendo descartar la posibilidad de que la degeneración Walleriana pudiera implicar un proceso pasivo de falta de nutrientes debido a la interrupción de la entrega de los mismos desde el cuerpo neuronal a la parte distal del axón.

La lesión nerviosa desencadena una serie de acontecimientos fisiopatológicos a nivel del cuerpo celular, de los segmentos nerviosos proximal y distal, de la zona lesionada y de los órganos diana¹⁰.

Después del traumatismo se objetiva un proceso de cromatolisis en el cuerpo celular, secundario al aumento de su contenido en ARN, apareciendo más redondeado (edema), más eosinófilo y con el núcleo desplazado hacia la periferia. El metabolismo celular cambia hacia la síntesis de proteínas de

membrana (tubulina, actina) en un intento de reconstruir el citoesqueleto axonal, disminuyendo la síntesis de neurotransmisores.

El término de degeneración Walleriana^{1, 11} define los cambios del segmento distal de nervios mielinizados, independientemente que se produzca el mismo proceso en el segmento proximal. Se inicia a las 48-96 horas de la sección presentando desensamblaje de los microtúbulos, ablonamiento del axón distal, desorganización axonal y degeneración de la mielina. El proceso se va completando con la fagocitosis por parte de los macrófagos de los detritus celulares y la estimulación de la proliferación de las células de Schwann¹².

Los macrófagos sintetizan dos importantes citocinas que favorecen la regeneración axonal (interleucina-1 (IL-1) y factor de crecimiento IGF tipo I)¹³. La IL-1 estimula la síntesis local de factores de crecimiento como son el factor de crecimiento nervioso (NGF)¹⁴, factor de crecimiento endotelial (VEGF)¹⁵, y el propio factor de crecimiento IGF I¹⁶. Aunque también desencadenan la cascada de la inflamación a través de los leucotrienos y son los responsables de la quimioatracción de las células responsables de la aparición de fibrosis¹⁷⁻¹⁹.

El tubo endoneural formado por el endoneuro intacto y la membrana basal de las células de Schwann, se colapsa y disminuye su diámetro, siendo ocupado por macrófagos y por las propias células de Schwann que se establecen en las bandas de Büngner. Dichas bandas crean un microambiente promotor para la regeneración axonal.

La lesión nerviosa puede llegar a interrumpir la barrera vascular, pudiendo entrar en contacto el nervio lesionado con proteínas no habituales y por ello iniciar una reacción autoinmune mediante la presentación como antígeno de las proteínas. Esta situación inmunológica potencia los procesos degenerativos porque favorece la aparición de fibrosis y la disminución de la tasa de regeneración.

Los órganos diana motores y sensitivos presentan también cambios secundarios a la denervación. Los músculos comienzan a disminuir su volumen en la primera semana, presentando una atrofia progresiva de las fibras musculares y una sustitución por tejido conectivo a partir de los tres meses. La recuperación funcional motora depende del lapso de tiempo en que el órgano diana está denervado, siendo excelente la reinervación entre 1 y 3 meses; manteniéndose la funcionalidad hasta el primer año y siendo improbable pasados tres años²⁰⁻²¹.

Al contrario que los músculos, los órganos sensitivos pueden llegar a ser reinervados después de largos periodos de tiempo sin estimulación nerviosa. Aunque no se ha definido un periodo crítico de reinervación sensitiva, un retraso de 6 meses en la reparación nerviosa disminuye también la recuperación funcional. Después de un año de denervación sólo se puede esperar una recuperación de la sensibilidad propioceptiva²².

Un aspecto importante de la degeneración Walleriana es que es eficientemente bloqueada por la presencia de la proteína Wld que aparece en el núcleo neuronal y podría inhibir la expresión de genes relacionados con el inicio de la degeneración nerviosa en respuesta a daño. En presencia de señales iniciadas por el daño axonal, se desinhibirían dichos genes iniciándose así los procesos de daño axonal ²³. Adicionalmente, la degeneración podría iniciarse por un incremento en los niveles de calcio disparado por la lesión axonal.

Junto al papel que juega la proteína Wld, la degeneración Walleriana depende también de la activación del sistema Ubiquitin-proteasoma, ya que el bloqueo de este sistema en una ventana de tiempo determinada, inhibe la degeneración ²⁴.

1.3.3 Fisiología de la regeneración nerviosa

La regeneración axonal es un proceso complejo y coordinado que ocurre tras la lesión axonal. Mientras el segmento distal a la lesión sufre un proceso de degeneración Walleriana descrito en el apartado anterior, en la parte proximal se suceden básicamente 3 fases que suponen un intento de reparación de la lesión y al posible restablecimiento funcional de la misma. Estas fases son las siguientes:

a) Resellado de la membrana.

Este es uno de los primeros acontecimientos que ocurren y es previo a la formación de los conos de crecimiento y al inicio del crecimiento axonal.

La disrupción de la membrana axonal pone en contacto de forma transitoria el axoplasma axonal y el medio extracelular, lo que conlleva a una rápida entrada de iones sodio y calcio que existen en mayores concentraciones a nivel extracelular que intraaxonal. Parece que el aumento de los niveles de sodio y calcio intracelular por encima de los valores fisiológicos supone una señal que

inicia el proceso de resellado de la membrana neuronal que es el primer paso para, mediante los transportadores iónicos y las bombas existentes en la membrana se restablezcan las concentraciones fisiológicas de iones que permitan la posible restauración de la actividad eléctrica nerviosa ²⁵

Otros factores que también influyen de forma marcada en el resellado de la membrana proximal a la lesión incluyen la proteasa calpaina y la enzima fosfolipasa A2 que son activadas por calcio. La acción de estas enzimas consiste en aumentar el desensamblaje del citoesqueleto para facilitar el acercamiento de los componentes de la membrana ²⁶.

b) Generación del cono de crecimiento

Durante las primeras seis horas se produce una regeneración axonal de varios milímetros a través de los espacios creados por la retracción de las células de Schwann. Dicho primer brote axonal es sustituido durante las primeras 27 horas por un brote axonal permanente que consiste en un citoesqueleto conformado por las proteínas del axón, creando de este modo una unidad regeneradora delimitada por el perineuro²⁷. Inicialmente las fibras son amielínicas, independientemente del nervio de origen, y posteriormente se generan las mitosis y los cambios morfológicos de las células de Schwann para generar la cubierta mielínica²⁸.

A nivel del extremo distal de cada brote axonal se encuentra una filopodia rica en actina denominada cono de crecimiento. Dicho cono es una estructura móvil especializada como aparato explorador y presenta una afinidad por la superficie interna de la lámina basal creada por las células de Schwann²⁹⁻³¹. Un aspecto importante a resaltar consiste en que el aumento en la concentración de calcio y la activación local de calpaina parecen ser necesarios para la formación del cono de crecimiento ³². El cono segrega proteasas que disuelven la matriz y la fibrosis cicatricial para promover la regeneración hacia su órgano diana.

Un tipo de células que juega un papel primordial en el desarrollo del cono de crecimiento son las células de Schwann, que al ser denervadas producen muchos factores de crecimiento como son: factor de crecimiento cerebral (BDNF); factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF); factor neurotrófico ciliar (CNFT); factor inhibidor de leucemia (LIF) factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Los conos de crecimiento poseen receptores para dichos factores, lo que les permite optimizar su respuesta a los estímulos tróficos ³³. Estos factores neurotróficos son proteínas macromoleculares segregadas que son clave para la supervivencia, extensión y maduración neuronal. El factor neurotrófico original es un factor de crecimiento que promueve la supervivencia y el crecimiento

axonal, presenta una función quimiotáctica como guía de la regeneración axonal y afecta a la morfología del cono de crecimiento³⁴⁻³⁵. Son componentes responsables de originar la banda de Büngner o banda de regeneración axonal. La activación de estos receptores para factores tróficos inicia la activación de la PI3 cinasa en el cono de crecimiento, lo que conlleva a la fosforilación y subsecuente activación de la GSK3 β para promover el crecimiento axonal³⁶.

c) Interacción del axón con la matriz extracelular y respuesta a las señales de crecimiento.

Los conos de crecimiento son capaces de detectar señales extracelulares que les sirven de guía durante su crecimiento. Muchas de estas señales están alteradas tras una lesión nerviosa. Entre ellas nos encontramos: netrinas, semaforinas, efrinas y proteínas morfogénicas de hueso. Las más importantes son las netrinas y las semaforinas. Las netrinas son factores quimiotrópicos bifuncionales que sirven para atraer o repeler conos de crecimiento a través de diversos receptores³⁷. La netrina y sus receptores están expresados en el sistema nervioso adulto y su expresión es inhibida tras sección nerviosa³⁸. Las semaforinas son fundamentalmente señales repulsoras al cono de crecimiento que inhiben su progresión y cuya acción está mediada por la formación de complejos mediados por neuropilina y plexina³⁹.

El éxito de la regeneración axonal periférica también depende de la interacción de los conos de crecimiento de los axones en regeneración que expresan integrinas con los componentes de la matriz extracelular como la laminina que es uno de los componentes mayoritarios de la lámina basal de las células de Schwann y está unida al colágeno tipo IV, a los proteoglicanos y a la entactina creando una estructura tridimensional que acelera la regeneración axonal. La fibronectina⁴⁰⁻⁴¹ junto con las moléculas de adhesión neuronal y N-caderina son otros factores que interaccionan con las integrinas.

La lámina basal representa el componente de la matriz extracelular al cual se adhieren los axones regenerados. A través de los túbulos de lámina basal se proveen los espacios por los que se produce el avance de los axones hacia el órgano diana⁴²⁻⁴⁴. El fibrógeno es un factor sintetizador de matriz, polimeriza junto a la fibronectina para formar una matriz de fibrina, que es otro importante sustrato para la migración celular en la regeneración nerviosa⁴⁵⁻⁴⁸. Inicialmente en las interrupciones nerviosas completas la fibrina se establece como el elemento original para la regeneración en la mayoría de los tejidos.

1.4 Estrategias para mejorar los resultados en la regeneración del nervio periférico

A pesar de los múltiples estudios destinados a mejorar la tasa de regeneración nerviosa, los resultados finales se mantienen en un plano discreto y se impone la búsqueda de alternativas que aumenten el éxito regenerativo. Si en el campo de la cirugía se estudian nuevas suturas con menor reacción inflamatoria asociada y que permiten el menor traumatismo en el momento de coaptar los extremos nerviosos; en otro plano no quirúrgico se buscan vías de estudio que abordan estrategias que se pueden agrupar en cuatro vías de estudio principales:

- farmacológica
- moduladores inmunológicos
- factores promotores
- tubos guía

1.4.1 Farmacológica

Existen sustancias que actúan a nivel molecular que modulan la regeneración nerviosa. Se ha demostrado el efecto positivo de los gangliósidos en la regeneración del nervio ciático en ratas⁴⁹⁻⁵¹. Los gangliósidos son neurotrópicos (favorecen la supervivencia y la conservación de las neuronas) y neuritigénicos (aumentan el número y tamaño de las ramificaciones de los procesos neuronales).

También se ha observado que moléculas como el forskolin que activan adenilato ciclasa pueden contribuir al crecimiento axonal⁵².

1.4.2 Factores tróficos

Entre ellos se incluyen los factores de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico ciliar (CNGF), factor de crecimiento vascular (VEGF), laminina, fibronectina, molécula de adhesión neuronal, N-caderina, factor de crecimiento fibroblastos (FGF), leupeptina, factor de crecimiento insulín-like (IGF I y II) y factor de crecimiento endotelial (VEGF).

1.4.3 Tubos Guía

Son cilindros que se emplean como guía para extremos nerviosos aproximados. La inclusión de los cabos nerviosos en el interior del tubo guía reduce el traumatismo quirúrgico y la porción cicatricial. Entre los extremos nerviosos se deja un espacio intencionado para permitir la realineación de los fascículos nerviosos. Dichos cilindros también permiten la administración local de agentes farmacológicos, moduladores inmunológicos o factores promotores.

Se han creado tubos guía de diferentes materiales: silicona, Gore-Tex, vena, duramadre autóloga, ácido poliglicólico.

El objetivo de las investigaciones es la búsqueda de un material que permita la difusión de nutrientes, oxígeno y potencie los factores introducidos localmente y que, en el tiempo, evite la compresión nerviosa.

1.5 Ingeniería Tisular

La terapia génica se presenta como una alternativa importante a las terapias tradicionales ⁵³. Debido a ella aparecen nuevas soluciones terapéuticas que actúan como implantes interactivos mediante los cuales se podría conseguir la reparación de tejidos dañados, corregir enfermedades o promover la curación local o sistémica.

La ingeniería tisular ha generado productos derivados de fibroblastos, matrices humanas o incluso implantes de cartílago que se consideran alternativas terapéuticas seguras, efectivas e innovadoras.

En la ingeniería tisular aplicada al tejido nervioso, se empiezan a obtener los frutos del trabajo multidisciplinar médicos, ingenieros y biólogos en un intento de crear una alternativa mejor al injerto nervioso. El planteamiento inicial es diferente frente a otros órganos, porque en este terreno el objetivo es diseñar vectores viables o canales guía y no órganos funcionantes como tales.

La regeneración nerviosa plantea unas bases que se aúnan en un dispositivo que pueda integrar tanto el beneficio de la terapia génica como la estructura básica del tejido nervioso (canales guía).

1.5.1 Bases de la terapia génica

Con este concepto identificamos los cambios en el contenido genético, tanto de ADN como del ARN, de las células, con el objeto de establecer una opción terapéutica.

Cada célula del cuerpo contiene la misma dotación de material genético pero presentan variaciones basadas tanto en tipo como en función, y que a su vez dependen de los diferentes segmentos de este mensaje que son expresados. El núcleo es el origen de la información, donde las proteínas reguladoras seleccionan los segmentos de ADN que se transcriben en ARN y que a su vez es procesado mediante procesos de corte y ensamblaje para finalmente producir una proteína. Las modificaciones en la expresión de las proteínas generan fenotipos diferentes en las células que son esenciales en el proceso de desarrollo y homeostasis.

En el proceso de terapia génica se contemplan cambios a dos niveles que pueden ser:

- Cualitativos, sustitución de un gen por otro.
- Cuantitativos, supresión o sobreexpresión de un gen

Uno de los avances en este campo es la génesis de células modificadas genéticamente para que transcriban una proteína que es la clave de la terapéutica en el proceso de la enfermedad. A medida que se establezcan los componentes básicos de las enfermedades se podrían aportar o suprimir determinadas proteínas para modificar o hacer desaparecer la patología.

1.5.2 Transducción

Con este concepto establecemos la introducción del material genético exógeno en los genes funcionales de la célula.

Existen dos métodos principales:

- Virales
 - Emplean la capacidad de los virus de infectar diversos tipos de células. Estos sistemas pueden proporcionar una gran capacidad de infección, aunque también pueden presentar toxicidad asociada a su administración. Los tipos de virus utilizados son:

I Retrovirus:

Son virus con una sola cadena de RNA con alta capacidad de insertarla en el material genético de la célula huésped. La información se transmite a las siguientes generaciones. Presenta dificultades, la introducción del material genético se realiza cuando la célula entra en división celular, produciendo en ocasiones la disrupción del material genético en vez de su integración y la apoptosis celular.

II Adenovirus:

Son virus con doble cadena de DNA capaces de transducir a las células independientemente del ciclo celular. Los virus empleados son mutaciones deficientes en replicación que presentan una delección del material con espacio suficiente para la inserción de genes terapéuticos. Pueden transducir múltiples células y la tasa de transducción es muy alta. El material genético se mantiene como un episoma y no siempre se transmite en la línea celular

III Virus adenoasociados:

Están constituidos por una cadena de DNA y tienen capacidad para infectar células en división o no. Se integran como los retrovirus, pero con la capacidad de transducción de los adenovirus. Se han detectado en la línea celular y dado que no presentan la codificación vírica, no presentan la respuesta inmune de los adenovirus.

- No virales
 - Menor toxicidad asociada que la producida por virus
 - Menor activación del sistema inmune
 - Menor garantía de transducción del material genético

I Microinyección:

La introducción del material se realiza mediante micropipetas y se busca la colocación de múltiples copias de la secuencia génica en el núcleo. Es un proceso lento y precisa de gran precisión y de equipamiento sofisticado.

II Plásmidos:

Es una estructura de DNA desnudo de configuración circular que las bacterias emplean para transmitir resistencias antibióticas. El mayor reto es conseguir la llegada del plásmido al núcleo celular. La molécula presenta una estructura aniónica que es repelida electrostáticamente por la superficie negativa de la membrana celular. Para su introducción se realiza un bombardeo de partículas de helio acelerado.

III Mediadores químicos:

Son capaces de atravesar la membrana celular mediante la neutralización de la carga negativa y la endocitosis del complejo. Como ejemplo tenemos liposomas, formados como microesferas de una bicapa lipídica que encapsula partículas de DNA. La eficacia en transfección es relativamente baja en el sistema nervioso.

IV Electroporación:

Se basa en la capacidad de crear poros en la membrana celular por campos eléctricos transmitidos en pulsos. Este método se ha demostrado eficaz en tejidos en cultivo.

1.6 El concepto de canal guía nervioso

Los canales guía pueden ser túbulos de origen natural o sintético que actúan como puentes en el defecto tisular generado entre ambos extremos nerviosos ⁵⁴⁻

⁵⁵. Las características básicas se agrupan de la siguiente forma:

- Capacidad de orientación de los axones en regeneración
- Reducir la aparición de tejidos fibrosos
- Permitir la difusión de factores neurotróficos.
- Reducir la tensión en el punto de neurorrafia
- Aumentar la concentración de proteínas endógenas
- Crear una barrera flexible entre la luz del canal y el microambiente que lo rodea.

Los materiales con alta permanencia en el tiempo no son los ideales porque provocan reacción a cuerpo extraño, aislamiento del microambiente

perinervioso, el riesgo de infección es alto, y pueden llegar a generar compresión nerviosa⁵⁶⁻⁵⁷.

El canal ideal deberá degradarse secuencialmente en correlación con la regeneración nerviosa, deberá mantener flexibilidad aunque tiene que tener resistencia ante el colapso en el momento de la implantación y en el desarrollo de los movimientos habituales.

Además del papel estructural básico deben tener un diseño que estimule activamente el proceso de regeneración y que incluyan factores biológicos críticos en la estimulación nerviosa.

En el ámbito de la regeneración nerviosa se establecen unas bases anatómicas que definen el tipo de vector o canal guía nervioso. En este análisis establecemos cuatro apartados que nos clasifican dichos canales guía según el tipo de subcomponentes que incluyan⁵⁸

I. Tipo de pared

- Materiales naturales
- Vena
- Laminina, fibronectina y colágeno
- Materiales no biodegradables
- Silicona
- Materiales sintéticos biodegradables
- PGLA
- Poliuretanos
- Poliorganofosfazanos

II. Componentes estimulantes de la regeneración

- factores estimulantes de crecimiento
- presencia de células
- con/ sin transfección y expresión de factor de crecimiento

III. Componentes con matrices internas

- Colágeno y geles de laminina

- Fibras internas
- Canales subliminales
- Músculo acelular

IV. Aloinjerto y Xenoinjertos

- Inmunosupresión con aloinjertos
- Aloinjertos acelulares

1.6.1 Materiales biocompatibles como canales guía

Se han estudiado ampliamente los materiales naturales como la base para crear el canal ideal. El canal guía ideal debe cumplir los siguientes criterios:

- Biocompatibilidad
- Disminución de los efectos tóxicos
- Activación de la migración de las células de Schwann
- Activación de los axones

Así mismo, debe minimizar la aparición de los siguientes efectos secundarios no deseables como:

- Poder generar respuesta inmune
- Incapacidad para controlar las propiedades mecánicas
- Poder alterar resultados actuando como potenciadores de cascadas de inflamación o por la activación tanto celular del propio canal o por péptidos derivados.

El empleo de canales guía naturales data desde el inicio de la reconstrucción de la continuidad de los nervios. En 1891 se emplearon las arterias como conductores de la continuidad nerviosa, pero se descartaron por la morbilidad asociada y fueron sustituidas por las venas⁵⁵.

El primer injerto venoso se publica en 1909. Estudios posteriores demuestran que son dispositivos beneficiosos tanto para realización de una cobertura de la sutura nerviosa, como para los casos en los que existen soluciones de continuidad pequeñas. Por el contrario, en la situación en que la distancia entre

ambos extremos nerviosos es elevada, se produce un colapso intraluminal que impide la progresión de los fascículos nerviosos conduciendo a un proceso cicatricial que ocluye la luz interna⁵⁹.

Entre otras opciones sustitutivas de canales guía nerviosos se encuentran los dispositivos conformados por fibras musculares⁶⁰. Los experimentos *in vitro* han demostrado que la introducción de músculos acelulares se comportan como la estructura de la lámina basal del tejido nervioso permitiendo el avance de las células de Schwann en la línea de Büngner. El principal inconveniente que presenta es la aparición de neuromas en continuidad por la estructura entrelazada de los sarcolemas.

Otra alternativa con poco uso en la clínica diaria es el empleo de aloinjertos y xenoinjertos⁶¹⁻⁶³. En ambos casos hay que disminuir la acción de la respuesta inmune del sujeto receptor. Existen varios métodos para evitar el rechazo y mantener las propiedades del injerto como son los procesos de congelación o extracción por detergente. En ambos casos se eliminan los componentes celulares y se mantiene la estructura básica de túbulos de laminina del tejido nervioso, que son la base morfológica de la regeneración.

Múltiples estudios reflejan un retardo en la regeneración en este tipo de reconstrucción debido a la falta de estímulo celular. La adición de componentes como factores de crecimiento o células de Schwann autólogas permite presentar futuras aplicaciones en la clínica⁶⁴.

De estas características contrapuestas aparecen canales guía semiartificiales derivados de moléculas naturales. Se desarrollan nuevos componentes derivados de la laminina, fibronectina y colágeno^{47,65,66} e incluso se modifican los canales naturales, como las guías de venas, a las que se añaden cubiertas intraluminales de colágeno o inversiones de la posición natural, quedando la superficie rica en colágeno hacia la luz del tubo guía.

1.6.2 Materiales sintéticos como canales guía

La composición química de los canales guía establece un papel fundamental en la regeneración porque la respuesta inmune a un cuerpo extraño varía considerablemente de un material a otro. Eliminando esta cuestión, los materiales biocompatibles son una línea de investigación altamente desarrollada desde el campo de la química.

Existen varios materiales biosintéticos que son capaces de potenciar la regeneración nerviosa.

Poliésteres tipo ácido poliláctico, ácido poliglicólico o la mezcla de los dos anteriores se han establecido como las bases de los materiales biosintéticos⁶⁷. La mezcla de ácido poliláctico y poliglicólico (PLGA) es el menos irritante de los tres y permite su degradación en el tiempo⁶⁸. La aparición de nuevos poliésteres sintéticos, como el ácido poliepsilon caprolactona, establecen a estos ésteres como la base sintética futura para la regeneración nerviosa.

1.6.3 Propiedades físicas de los canales guía

La importancia de las propiedades físicas establece unas bases que determinan claramente unos efectos sobre la regeneración. Algunas de estas propiedades son las dimensiones, la porosidad, textura de la superficie intraluminal y las características eléctricas.

- Dimensiones
 - Afecta tanto a la longitud como al diámetro. La distancia máxima para la regeneración de un nervio sin factores externos es 10 mm y 25 mm con factores de crecimiento.
 - El diámetro de 1.8 mm presenta mejor regeneración que diámetros de 1.2 mm o 3.1 mm ⁶⁹.
- Porosidad
 - Afecta a la difusión de factores solubles. Los canales con poros de 50 kd muestran regeneraciones superiores a los impermeables, frente a porosidades superiores a 100 kd que sugieren que dicha magnitud permite la entrada de moléculas inhibitorias ⁷⁰⁻⁷¹.
- Textura interna
 - Se considera que la superficie lisa regenera túbulos nerviosos separados del canal por epineuro, mientras que la superficie rugosa regenera con tejido conectivo y axones sin mielinizar.
- Características eléctricas
 - La electroestimulación se emplea para activar la regeneración nerviosa en la práctica clínica habitual. Basándonos en esta técnica

de tratamiento se están desarrollando polímeros eléctricamente activos.

1.6.4 Propiedades biológicas e interactivas de los canales guía

Estableciendo la estructura biológica de un canal se puede activar la regeneración nerviosa. En este aspecto tenemos las matrices en tres dimensiones que facilitan la migración axonal, inclusión de factores de crecimiento o células de soporte.

1. Matrices extracelulares de tres dimensiones incluyen la laminina, fibronectina y algunas formas de colágeno^{44, 72-73}.

- Laminina
 - La concentración de proteínas establece un límite dicotómico entre un aumento en la regeneración o por el contrario la dificultad de la misma.
- Fibrina
 - Es el componente principal en la estimulación del crecimiento axonal. Rellena de forma natural los canales guía vacíos permitiendo la creación de matrices orientadas. Para acelerar este proceso se podrían emplear matrices cuyos componentes fibrilares se presentan alineados representando los fascículos intraneurales.

2. Además de las matrices otro componente que se incorpora en la regeneración son los factores de crecimiento. No todos tienen efecto sobre la regeneración nerviosa, ni tampoco actúan en un único sentido. Se puede diseñar una clasificación que establezca las bases principales de acción, aunque en algunos casos se pueden solapar varias acciones.

- Regeneración
 - Factor de crecimiento neurotrófico (NGF)⁷⁴⁻⁷⁵
 - Producido por la células lesionadas (neuronas con células de Schwann). Se ha observado que aumenta la mielinización de los axones regenerados y el número de vasos sanguíneos.

- Factor neurotrófico cerebral (BDNF)^{76-77, 78}
 - Se genera a nivel del sistema nervioso periférico. Su acción parece ser una activación del crecimiento del cono axonal, pero tiene una autorregulación con un límite bajo en los receptores que impide potenciar su acción.
- Factores de crecimiento tipo insulina (IGF-1 IGF-2)⁷⁹⁻⁸⁰
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)⁸¹
- Factor de crecimiento derivado de endotelio (VEGF)^{15, 82-84}
 - Es secretado por células endoteliales, macrófagos. Induce un mejor crecimiento axonal y un aumento de los brotes axonales de regeneración. Aumentan la proliferación de células de Schwann.
- Supervivencia neuronal
 - Factor neurotrófico ciliar (CNTF)^{85, 86-87}
 - Producido por la células de Schwann en correlación con el nivel de reinervación. Parece ser muy importante en la supervivencia de motoneuronas.
 - Interleucina 1 (IL-1)^{88, 89, 90}
 - Factor de crecimiento endotelial (VEGF)
 - Realiza esta acción por la proliferación endotelial que permite la nutrición de la zona en regeneración
- Crecimiento axonal y extensión
 - Factores de crecimiento tipo insulina (IGF-1 IGF2)^{79, 91}
 - Factor de crecimiento de fibroblasto (a-FGF y b-FGF)⁹²⁻⁹⁴
 - Factor de crecimiento neurotrófico (NGF)⁹⁵⁻⁹⁷

Estos factores se segregan de manera natural por la propias células implicadas en el proceso regenerativo. Un ejemplo lo constituyen las células de Schwann que segregan NGF, BDNF, IGF-1, y CNTF o los macrófagos que segregan PDGF y IL-1.

La incorporación de los factores de crecimiento establece vías de desarrollo de este aspecto de la regeneración.

3. La inclusión de células de soporte neuronal es otra área de desarrollo que activa la regeneración celular. Las propias células se establecen como generadoras de factores tróficos neuronales y pueden disponerse en las matrices lineales.
 - Modificaciones genéticas. Mediante esta alteración pueden obtenerse niveles de factores neurotróficos preestablecidos o la expresión de determinadas proteínas.
 - Fibroblastos
 - Células de Schwann
 - Células endoteliales

1.6.5 El factor de crecimiento endotelial

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) es junto con otras moléculas los promotores de la angiogénesis a todos los niveles, pero es esta molécula la única específica para las células endoteliales. Actualmente es la proteína más usada para el estudio del desarrollo del sistema vascular en el embrión⁹⁸ mientras que en el adulto se focaliza en su actividad como angiogénico e incrementador de la permeabilidad vascular especialmente en el sistema nervioso central⁹⁹. En las últimas investigaciones se ha observado su capacidad para estimular el crecimiento axonal y la supervivencia neurona e incluso se han detectado receptores tanto en los componentes neuronales como en las células de la glia¹⁰⁰⁻¹⁰².

En la naturaleza se presenta con isoformas que son medidas en función de su adherencia con la heparina. La proteína realiza su acción mediante la unión con dos tipos de receptores de la fosfoquinasa: flk-1 yflt-1. El receptor de la fosfotiroquinasa tipo fms (flt-1) y el receptor de la fosfotiroquinasa del hígado fetal (flk-1). La ausencia de cualquiera de estos receptores impide la embriogénesis, no se genera el desarrollo del sistema vascular, y la muerte del embrión.

La interacción a nivel de la membrana celular se produce mediante dos monómeros de la proteína VEGF que se combinan con los terminales bisulfito

del receptor y forman un dímero. A continuación los dos receptores de la tirosinasa forman otro dímero que se incorpora a un proceso de autofosforilación con los residuos de la tirosinasa, iniciando la señal de transducción. La activación del receptor flk-1 implica la mitosis celular a nivel de células endoteliales y su migración. La activación del receptor flt-1 sólo implica migración celular. La cascada química exacta se desconoce pero se presupone que debe ser vías químicas diferentes.

Las células endoteliales presentan un receptor específico para VEGF con una masa molecular menor que flk-1 o flt-1. Este receptor es el resultado de la expresión de los genes de la neurofilina-1 y neurofilina-2.

Se puede detectar la existencia del receptor flk-1 en los cuerpos neuronales, conos de crecimiento axonal, axones y células de Schwann, incluso en estas últimas se ha detectado la expresión del receptor flt-1^{82, 103}.

También se ha demostrado la existencia de receptores de neurofilina 1 en los conos de crecimiento axonal, en los somas neuronales del ganglio dorsal. La neurofilina-1 parece ser que establece directrices químicas en el crecimiento axonal durante el desarrollo de embriones y su ausencia genera defectos vasculares incompatibles con la vida. Su presencia aumenta la capacidad de unión entre el receptor flk-1 y VEGF, incluso frente a la competencia que puede presentar la semaforina tipo 3, que es una molécula que media las señales inhibitorias de crecimiento axonal⁸².

La afinidad del factor VEGF por el receptor flk-1 se establece a nivel del cuerpo neuronal como respuesta al daño tisular periférico de los axones. La presencia de VEGF en el soma neuronal se ha podido observar por la existencia de un transporte retrógrado que realiza la propia célula. Presenta acciones locales y centrales, de modo autocrino y paracrino. Su acción autocrina se observa mediante la ligadura de un nervio funcionando y la posterior presencia de acúmulos distales a la ligadura de VEGF que son transportados por el propio axón dañado de un modo retrógrado¹⁰⁴.

La acción paracrina de VEGF se puede reproducir mediante la adicción de dicha proteína a injertos acelulares de nervio y observar el estímulo en la migración de las células de Schwann, activando el proceso de regeneración nerviosa¹⁰⁵.

La inmunohistoquímica demuestra que la positividad para VEGF es común a células que presentan alta afinidad por el factor NGF. La presencia de bajas concentraciones de NGF tiene una acción aditiva con el efecto VEGF y el crecimiento axonal.

Se ha podido demostrar el comportamiento del factor como neurotrófico en varios aspectos; supervivencia neuronal, crecimiento axonal, cambios en respuesta al daño axonal y en el transporte axonal. Los últimos descubrimientos parecen establecer la proteína VEGF como un regulador importante tanto de la vasculogénesis como de la neurogénesis¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Estos aspectos parecen reforzarse con los cambios temporales en la expresión del factor y sus receptores en las células nerviosas en el período de desarrollo. El descenso en la expresión de VEGF durante el desarrollo del embrión genera un retraso en el crecimiento neural y su desarrollo, así como anormalidades en la evolución de la angiogénesis¹⁰⁹.

Hipótesis

2 HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis

En base a lo anteriormente expuesto respecto a los últimos avances en regeneración nerviosa y las técnicas quirúrgicas actualmente de primera elección, nos planteamos cómo podríamos obtener un sistema de regeneración nerviosa reproducible y aplicable a todos los sujetos y en especial en los sujetos en crecimiento. Los niños en su desarrollo no deberían ver alterada la recuperación y las funciones motoras y sensitivas relacionadas con reparaciones nerviosas tanto a nivel central como periférico.

Nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

La regeneración nerviosa periférica puede ser estimulada mediante un dispositivo que incluya tres componentes:

- Dispositivo guía biológico y compatible
- Matriz extracelular favorecedora de la regeneración
- Células transfectadas para producir en un período suficiente factores de crecimiento.

2.2 Objetivos

Para comprobar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos.

1. Estudiar el comportamiento de los injertos nerviosos tradicionales.
2. Estudiar el comportamiento de la regeneración nerviosa a través de guías biológicas con sustancias extracelulares potenciadoras de dicha regeneración.
3. Estudiar la regeneración nerviosa en guías biológicas con células transfectadas (se utilizará como vehículo adenovirus) que expresan factor de crecimiento endotelial.
4. Valoración de dicha regeneración mediante métodos morfológicos que nos diferencien entre la activación y la aparición de respuesta inflamatoria.
5. Estudio inmunohistoquímico de la actividad de las células transfectadas, la pervivencia en el sistema y la generación de efectos colaterales.

Materiales y Métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Instalaciones

La estabulación, el tiempo quirúrgico, la obtención de muestras se realizaron en las dependencias del Centro de Biología Molecular (CBM) y Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Las condiciones ambientales del animalario fueron controladas de tal forma que la temperatura ambiente oscilaba entre los 18 y los 22 °C, con una humedad relativa del 50%, y un buen control de la ventilación. Los ciclos luz-oscuridad fueron de 12 horas.

El estabulario destinado a los conejos es amplio, manteniéndose aislados en jaulas separadas en todo momento, tanto en las fases de preoperatorio como en el postoperatorio.

Cada animal se clasificó en función de la fecha de nacimiento, fecha de intervención y técnica quirúrgica empleada.

3.1.2 Animal de Experimentación

El animal de experimentación que se escogió para llevar a cabo los objetivos de la Memoria fue conejo raza New Zealand, hembra, con un peso inferior a los 3 Kg.

Los animales recibieron comida y bebida ad libitum.

Se ha elegido al conejo raza New Zealand por varias razones:

- Manejo sencillo en el preoperatorio y postoperatorio
- Buena disponibilidad de los ejemplares.
- Los parámetros generales de este animal están ampliamente definidos y estudiados para su correcto control.
- Es un animal que se ha utilizado en múltiples estudios en el campo de la regeneración nerviosa y especialmente cuando se emplean técnicas

quirúrgicas de microcirugía debido al mayor tamaño de la estructuras respecto a la rata.



Ilustración 3 Conejo raza New Zealand

El número total de conejos raza New Zealand empleados para llevar a cabo los objetivos de la Memoria fue de 60. Se confeccionaron dos grupos aleatorios formados por 25 conejos cada uno para los estudios experimentales (objetivos 2, 3 y 4 del a Memoria) y 10 conejos como controles en terapia tradicional de injerto nervioso (objetivo 1 de la Memoria).

3.1.3 Protocolo Experimental

Este estudio se ha adaptado a la directiva publicada por el Consejo de Europa en noviembre de 1986, que indica las disposiciones legales reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros con relación a la experimentación animal para los protocolos experimentales, y a la legislación española sobre

protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (B.O.E. núm., 67, viernes, 18 de mayo de 1988, pp. 8509-12).

3.1.4 Material Quirúrgico

Instrumental quirúrgico cortante y de disección de tejidos.

- Mango de bisturí nº 2 y hoja del nº 15.
- Pinzas de disección de Adson con y sin dientes.
- Tijeras de Metzenbaum.
- Mosquito.
- Portaagujas.

Instrumental microquirúrgico.

- Portaagujas de Barraquer sin cierre.
- Tijeras de Westcott de microcirugía.
- Pinzas rectas de microcirugía.
- Sutura nylon nº 9.

Material específico para la cirugía nerviosa regeneradora.

- Geles de matriz de fibrina.
- Geles de matriz de fibrina con fibroblastos transfectados con VEGF.

3.2 Metodología

3.2.1 Confección de los grupos de estudio

Se emplearon un total de 50 conejos, distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 25 elementos que se subseleccionaron según el tiempo de evolución (Tabla 1):

- 7 días, 21 días, 80 días.

La secuencia temporal se definió por dos parámetros que fueron la supervivencia de las células transfectadas y la biología de la regeneración

nerviosa en los canales guía. La secreción de VEGF por las células fue máxima en los primeros momentos del diseño del experimento y su efecto se pudo detectar desde las primeras horas de la sección nerviosa. El primer dato temporal coincidió con las tasas máximas de supervivencia celular y el desarrollo de las fases iniciales de la regeneración nerviosa periférica.

El período de 21 días se definió por el estudio de Windeback y Poduslo que postula la presencia de factores neurotróficos secretados por las células de Schwann a bajas concentraciones durante un periodo de 2-3 semanas.

El parámetro de 80 días correspondió a la consecución de la regeneración final en el defecto creado.

Tabla 1. Subselección de los conejos según el tiempo de evolución

Grupos de estudio	Autoinjerto nervioso	Gel de fibrina	Células transfectadas	Total
7 días	3	10	10	23
21 días	3	10	11	23
80 días	3	5	5	13
	9	25	26	60

3.2.2 Intervenciones quirúrgicas

En esta memoria se realizaron dos tipos de actos quirúrgicos secuenciales para analizar el desarrollo de los animales:

- Cirugía para la sección nerviosa y establecer los distintos grupos a estudio.
- Cirugía para la toma de resultados al finalizar cada período a estudio.

- En cada animal del grupo III, se tomaron 2 centímetros cuadrados de piel que se emplean para crear el gel con las células transfectadas.

3.2.3 Método de cultivo celular

Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera de 37°C saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió en función del estado de las monocapas celulares.

Los fibroblastos se obtuvieron de biopsias de piel (2 cm²) de cada uno de los conejos mediante diferentes procesos de digestión enzimática. Se realizaron dos rondas de digestión con tripsina y centrifugado a 1000 rpm durante 7 minutos, el sobrenadante estaba formado por fibroblastos y queratinocitos que son separados por la collagenasa A (0,25% en PBS). Este primer sedimento celular se cultivó en un medio de Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico.

3.2.4 Preparación de los geles de fibrina

La fibrina se obtiene de crioprecipitados de sangre de conejo. Se congeló a -80° durante al menos 2 horas y se descongeló a 4°C para obtener el crioprecipitado. Posteriormente se introdujo en tubos de Falcon de 50 ml y se realizó centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos y se mantuvo la temperatura a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se calentó a 37°C para disolver completamente el fibrinógeno.

El gel de fibrina se preparó con 500 microlitros del medio de cultivo de DMEM al que se añadió 10x10⁶ fibroblastos, 5000 unidades de aprotinina bovina, 11 unidades de trombina bovina diluida en 1 ml Cl-Ca al 0.025 nM. La mezcla se inyectó de forma intravenosa manteniendo en posición hasta la creación del gel un minuto más tarde.

Producción de los vectores adenovirales

Los vectores adenovirales utilizados en la Memoria derivan de adenovirus humanos del serotipo 5, con deleciones en las regiones E1A, E1B y E3. La expansión del vector adenoviral se realizó transduciendo células 293

(sembradas en placas de 150 mm de diámetro) a un 90% de confluencia. Las células se incubaron con el vector durante 1 hora en 1 ml de medio DMEN, libre de suero. Tras la incubación, se añadió medio al 5% de FBS y 1% de antibiótico-antimicótico. Cuando se visualizó el efecto citopático total en las células del cultivo, se recogió el sobrenadante y se guardó a -80°C hasta su utilización.

La titulación del vector se realizó por ensayos de placas de lisis, que consiste en incubar placas de células con diferentes diluciones del sobrenadante adenoviral y cubrirlas con un medio semisólido, formado por agarosa 1% diluida en 2xMEM suplementado con 10% de suero de caballo inactivado, 2% de antibiótico-antimicótico, 4 mM de L-glutamina y 0,2% de extracto de levadura. La difusión de los vectores adenovirales formados de novo está limitada por la trama de agarosa, de forma que cada vector origina una única placa de lisis. La concentración del vector se determina por la fórmula:

$$\text{Pfu/ml} = (\text{n}^\circ \text{ de placas de lisis}) \cdot (\text{factor de dilución}) / (\text{volumen de infección})$$

3.2.5 Manejo del animal de experimentación

3.2.5.1 Preoperatorio

Los animales permanecieron en sus jaulas hasta el momento del inicio del acto anestésico, que fue realizado por personal especializado en este tipo de animal. Además de la anestesia general se procedió a la colocación de anestésico local que disminuyó las dosis generales y la reactividad del animal.

3.2.5.2 Técnica anestésica

Se extrajo el animal de su jaula y se inyectó intramuscularmente un relajante muscular lo que permite canalizar una vía venosa para el mantenimiento de la anestesia durante la intervención. La vena elegida es la vena caudal del pabellón auricular.

La anestesia del animal se realizó con atropina 0.1 mg por kg de peso valium 0.5 mg por kg de peso y xilacina Rompur® Bayer S.A., Leverkusen, Alemania con dosis de 10 mg por kilogramo de peso.

Después de inyectar el anestésico se controló la narcosis del animal con el reflejo palpebral y el ritmo respiratorio.

En las zonas operadas se aumentó la analgesia con la adicción de anestésicos locales, 3 centímetros cúbicos de lidocaína al 1%.

Al despertar, como no precisó intubación, requirió unos cuidados mínimos y fue suficiente con dejarlo en la jaula con empapadores para preservarlo de la hipotermia.

3.2.5.3 Técnica quirúrgica

La pierna y cadera del animal se depilaron mediante un producto químico tricolítico dejando despejada el área de incisión. Se pinceló mediante solución jabonosa de clorhexidina al 2%, colocando paños estériles y delimitando el campo.

El área fue iluminada por un foco quirúrgico que se complementó con una luz fría de alta intensidad para las secuencias de microcirugía.

Se realizó un abordaje sagital medio que trascurrió desde la zona glútea del animal hasta los cóndilos femorales, incluyendo a veces la disección de la articulación de la rodilla. En esta zona se disecó la vena glútea, que posteriormente se invirtió de modo que la zona distal se anastomose con el cabo nervioso proximal. Se disecaron unos 6 centímetros, realizando lavado con aguja de 18 G, y se almacenó con suero salino estéril (Ilustración 4).



Ilustración 4 Exposición de la fase de toma del fragmento venoso.

Distal a la cabeza femoral, se realizó la separación entre el bíceps femoral y el vasto lateral que dejan expuesto el nervio ciático que a su vez se divide en tibial y peroneo (Ilustración 5).

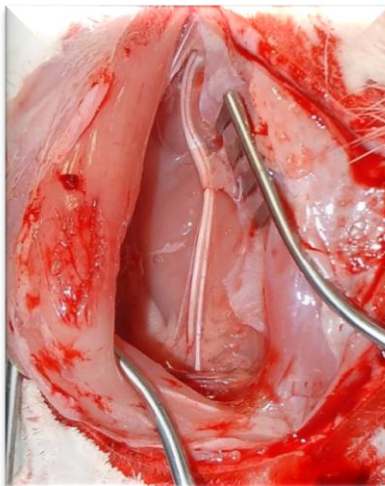


Ilustración 5 Disposición de la anatomía de los nervio tibial y peroneo

La sección se realizó en el nervio peroneo, extirpando 4 centímetros del mismo.

Después se ejecutó la operación seleccionada según el grupo al que pertenecen los animales.

- Grupo I: sección del nervio e interposición del fragmento extirpado como injerto libre (Ilustración 6).



Ilustración 6 Especimen con sutura nerviosa

- Grupo II: sección del nervio e interposición del fragmento venoso como tubulo guía con matriz fibrilar sin células (Ilustración 7).



Ilustración 7. Especimen con vena interpuesta y relleno con fibrina

- Grupo III: sección del nervio e interposición del fragmento venoso ocupado por matriz fibrilar y fibroblastos expresando factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Ilustración 8).



Ilustración 8. Especimen con interposición de vena rellena de fibrina con fibroblastos transducidos

Todas las suturas se realizaron con 9.0 de Ethilon y se comprobó la posición de las posibles válvulas endovenosas para que no interfirieran en el futuro crecimiento axonal.

Por último se cerraron los músculos con vicryl 4-0 y la piel con Ethilon 4-0.

3.2.5.4 Postoperatorio

Todos los animales dispusieron de agua y comida ad libitum. En el agua se administró ácido acetil salicílico a dosis de 2,5 mg por kilogramo y día para el tratamiento antiálgico y antiinflamatorio.

En el postoperatorio inmediato se administró dosis de antibiótico penicilina a dosis 50 mg por kilogramo de peso.

Como paso siguiente se realizaron unas fichas quirúrgicas como base para el estudio posterior de los datos.

Tabla 2. Ficha Quirúrgica

Protocolo quirúrgico	
Número	
Grupo	
Peso	
Fecha de la 1ª Cirugía	
Complicaciones y hallazgos	
Fecha de la 1ª Cirugía	
Complicaciones y hallazgos	

3.2.5.5 Segunda cirugía

Todos los grupos tuvieron tiempos comunes para el sacrificio de los animales que fueron a los 7, 21 y 80 días.

Las dos primeras cifras corresponden al tiempo de máxima actividad descrita *in vitro* para la acción del VEGF basándonos en la vida media de las células transfectadas.

La tercera cifra corresponde a la regeneración nerviosa del fragmento extirpado, basándonos en la tasa de regeneración del animal de 0.25 mm por día, con variaciones de 0.1666 hasta 0.49 mm por día y la llegada de la regeneración axonal a la motoneurona muscular y la consecución de la función de la zona operada.

El sacrificio del animal se produjo mediante pentotal a dosis letales. Se incidió en la zona operada para obtener la muestra que se preservó en formaldehído al 10% neutralizado con buffer fosfato o glutaraldehído. La diferencia entre ambos medios es debido a los estudio anatomopatológicos que se emplean, la microscopia óptica o la electrónica.

3.2.6 Métodos de valoración

3.2.6.1 Valoración clínico-quirúrgica

Se valoraron los rasgos básicos del comportamiento, buscando posibles alteraciones de la cicatrización o infecciones intercurrentes. También se comprobó posibles cambios de actitud de la extremidad operada.

En la segunda cirugía se valoraron:

- Grado de dificultad en la disección de tejidos blandos.
- Coloración y aspecto de viabilidad de la zona.
- Signos de infección.
- Aparición de estructuras no existentes previamente (neuromas).

3.2.6.2 Estudio histológico

3.2.6.2.1 Tasa axonal de regeneración

Se cuantificó teniendo en cuenta la proporción entre la longitud de los axones y la longitud del injerto. Se realizó mediante inmunohistoquímica de los axones.

3.2.6.2.2 Cantidad de regeneración

Este dato asocia la existencia de axones regenerados con las características del nervio periférico que es su recubrimiento con mielina.

3.2.6.2.3 Infiltración por macrófagos

Mide la respuesta inflamatoria por parte de los tejidos adyacentes. El conteo se hizo en los tres grupos y fue muy importante en el caso del grupo III que presentó el injerto autólogo de fibroblastos.

3.2.6.2.4 Angiogénesis

Dado que el factor empleado en este estudio es el factor de crecimiento endotelial, es fundamental medir su acción sobre las células endoteliales de la pared de la vena.

3.2.6.3 Estudio Inmunohistoquímico

3.2.6.3.1 Anticuerpos frente a endoteliales (von Willebran)

3.2.6.3.2 Anticuerpos frente a neuronas en general (pgp 9.5)

3.2.6.4 Análisis estadísticos de los resultados

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa informático SPSS. Se consideró para todos los análisis que tenían significación estadística su el valor de p bilateral fue inferior a 0.05.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Comportamiento neurológico

En el análisis neurológico básico realizado en todos los animales sometidos a la cirugía no se apreciaron alteraciones en la deambulación a largo plazo. Sí se pudo observar una limitación en la movilidad de la extremidad operada en las horas inmediatas a la intervención, posiblemente secundaria al proceso inflamatorio derivado de la propia cirugía.

No se notificó ninguna alteración ni en el ritmo nutricional ni en la hidratación y ambos se mantuvieron en niveles óptimos sin diferencias entre los grupos.

4.2 Valoración clínico quirúrgica

Mediante la inspección directa de los tres grupos de animales no se observó ninguna alteración destacada del aspecto externo morfológico en la extremidad, ni tampoco de la deambulación, excepto en los casos en que apareció como complicación la infección. En estos casos, la dehiscencia de la sutura a nivel de la piel se acompañó de la dehiscencia de sutura muscular impidiendo la movilidad normal de la extremidad. Esta situación se presentó en dos animales, uno perteneciente al grupo I y otro del grupo III.

En el resto de especímenes la cicatrización fue buena y se encontró escondida bajo el pelo.

En las cirugías secundarias se visualizó en la zona de piel una pequeña línea sin alteraciones asociadas a la cicatrización cutánea. A nivel muscular se comprobó la presencia de la unión muscular y un grado medio de fibrosis de los tejidos previamente operados que permitió la obtención de la muestra sin dificultad. No se evidenciaron diferencias entre los tres grupos respecto a esta morfología básica.

Examinando el lecho operado se pudo observar variaciones notables entre los tres grupos que se desglosan a continuación.

4.2.1 Grupo I

A los 7 días se observó la presencia de tejido con situación inflamatoria y ligera hiperemia. En la zona de la sutura se comprobó la existencia de fibrina envolviendo la sutura y en 3 especímenes apareció un componente de líquido seroso que no se acompañó de producción purulenta. El calibre del nervio operado respecto a la norma no presentó grandes variaciones y las existentes eran debidas a la fibrina perinerviosa (Ilustración 9).

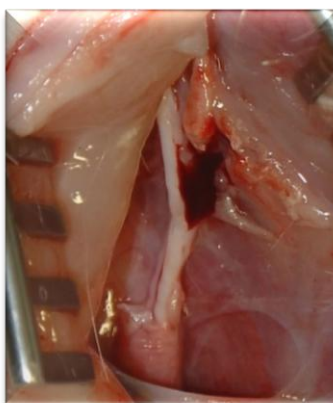


Ilustración 9. Especimen Grupo I Subgrupo 7 días

Se constató una variación importante en el calibre del nervio intervenido, tanto en el subgrupo de 21 días como en el de 80 días, en comparación con un nervio sin cirugías previas. En los 23 ejemplares de 21 días se observaron zonas de tejido con fibrosis mínima y la continuidad macroscópica a través de la sutura del nervio peroneo. No hubo presencia de hiperemia y se contabilizaron mínimas adherencias a los tejidos vecinos que no dificultaron la extracción. (Ilustración 10)



Ilustración 10. Especimen Grupo I subgrupo 21 días

En el subgrupo de conejos de 80 días se pudo comprobar la continuidad física del nervio aunque el calibre fue menor que antes de la cirugía. No se observaron adherencias y la extracción fue fácil.

4.2.2 Grupo II

Se visualizaron diferencias macroscópicas en todos los subgrupos de conejos que ponían de manifiesto la diferencia de tratamiento que se había llevado a cabo entre los tres subgrupos.

En el primer subgrupo de 7 días se observó el injerto integrado con ambos cabos proximal y distal introducidos en el componente venoso. La presencia de fibrina fue mínima e incluso menor que en el grupo I subgrupo 7 días (Ilustración 11).

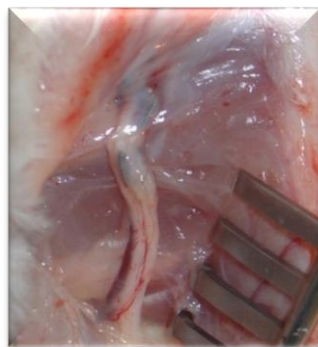


Ilustración 11. Especimen Grupo II Subgrupo 7 días

En los especímenes de 21 días se manifestó un injerto venoso de menor calibre que mantenía la estructura nerviosa integrada en la zona vascular (Ilustración 12)



Ilustración 12. Especimen Grupo II subgrupo 21 días

En el caso de los especímenes de 80 días se mantenía la estructura establecida por la cirugía pero el tamaño del injerto venoso fue menor cambiando la morfología y apareciendo acintado y filiforme.

4.2.3 Grupo III

Las piezas quirúrgicas de los animales de este grupo presentaron evidencias únicas que se establecieron como diferenciadoras respecto a sus comparativas de los grupos I y II.

A los 7 días se visualizó un entramado vascular que se encontraba en todos los planos quirúrgicos incluso en la propia piel. En la apertura de ésta se comprobó la presencia de un componente vascular que integraba un plexo dérmico y dependiente de una estructura similar que surgía a nivel muscular y desde la unión quirúrgica de los músculos. Siguiendo la recogida de muestras del protocolo se objetivó un aumento del volumen del componente nervioso y de la zona del injerto. Se mantuvo el aumento vascular rodeando el injerto y confirmándose la llegada vascular desde los vasos adyacentes (Ilustración 13).



Ilustración 13. Especimen Grupo III 7 días

A los 21 días se mantenía el aumento volumétrico tanto a nivel de los cabos nerviosos como en la zona del injerto de vena. Por el contrario se perfiló una disminución del componente vascular, que aunque disminuyó de tamaño y número, estableció nuevas estructuras vasculares en la zona (Ilustración 14).



Ilustración 14. Especimen Grupo III subgrupo 21 días

A los 80 días los casos presentaron buenos planos de disección y las estructuras se pudieron identificar fácilmente. Tanto el componente nervioso de ambos extremos distal y proximal, como el injerto venoso mantuvieron su volumen. El plexo vascular disminuyó pero la zona de injerto venoso mantenía formaciones vasculares propias diferentes del nervio tibial (Ilustración 15)

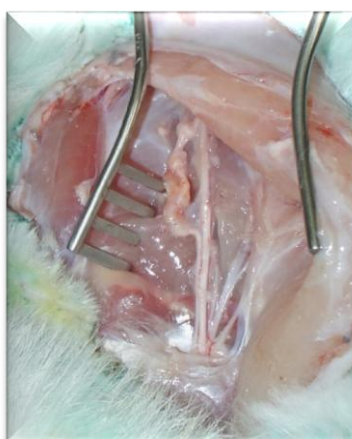


Ilustración 15. Especimen Grupo III Subgrupo 80 días

4.3 Valoración técnicas de Anatomía Patológica

4.3.1 Tinción de hematoxilina/eosina

4.3.1.1 Grupo I

En el primer subgrupo se observó degeneración Walleriana en ambos cabos nerviosos. A nivel de los puntos de sutura hubo presencia de células de cuerpo extraño rodeando el material y generando la presencia de macrófagos y fibroblastos, así como la formación de tejido de granulación. En algunos casos se comprobó la presencia de fibrina asociada a células sanguíneas.

En el cabo proximal la arquitectura nerviosa apareció desestructurada en las secciones más cercanas al punto de sutura frente a una disposición más longitudinal en otras zonas (Ilustración 16).

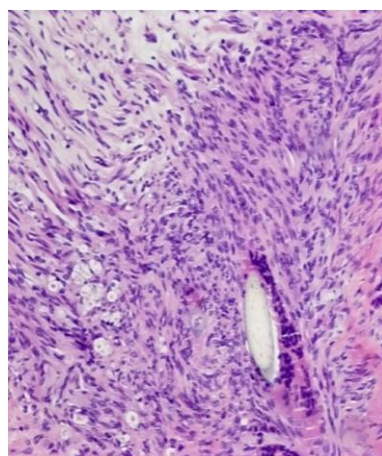


Ilustración 16. Especimen Grupo I subgrupo 7 días teñido con hematoxilina eosina.

A los 21 días se visualizaron la presencia de formaciones tipo neuroma acompañados de componentes eosinofílico y polimorfonucleares. Ambos extremos nerviosos mantuvieron una arquitectura conservada que se alteró en la zona de neuroma. Se constató la regeneración periférica con fascículos que progresan de una manera adecuada. En su gran mayoría el crecimiento longitudinal fue parcial porque parte de ellos se enfrentaron a una formación de neuroma que impidió su avance (Ilustración 17).



*Ilustración 17. Especimen Grupo I subgrupo 21 días
Cabo proximal y distal teñido con hematoxilina eosina.*

A los 80 días hubo presencia de tejido nervioso establecido como neuroma y se acompañó de regeneración de parte de los fascículos sin conseguir reproducir la arquitectura nerviosa. Se produjo la aparición de fibrosis y reducción volumétrica.

4.3.1.2 Grupo II

En las preparaciones correspondientes a 7 días la microscopia presentó cambios importantes. Se confirmó la presencia de células de cuerpo extraño rodeando la sutura que se localiza en posición externa a los fascículos nerviosos. Se comprobó la existencia de los extremos nerviosos introducidos dentro del injerto venoso y dentro de éste la existencia de fibrina con múltiples fibroblastos que no presentan la conformación habitual y se encuentran en estadios desdiferenciados.

También se pudieron identificar las características de la degeneración Walleriana del extremo proximal y distal (Ilustración 18).

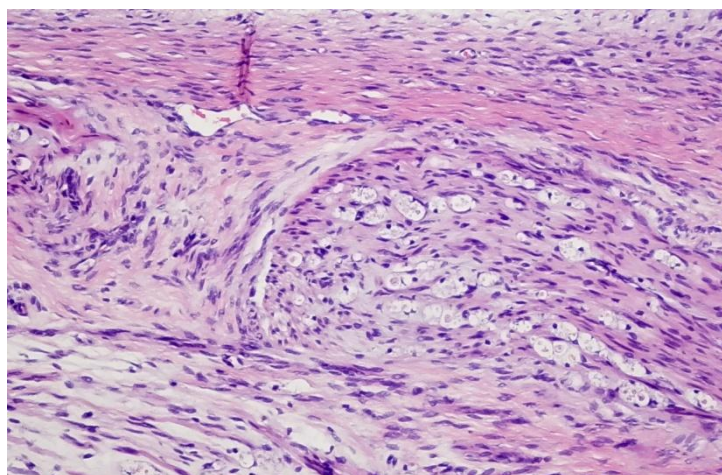


Ilustración 18. Especimen Grupo II subgrupo 7 días

A los 21 días se confirmó la presencia de regeneración nerviosa en algunos fascículos con disposición de las células de Schwann rodeando la regeneración axonal. También se observaron imágenes con frentes de regeneración de fascículos establecidos en Bandas de Büngner, pero con una tasa de regeneración escasa. Frente a estos se visualizaron fascículos sin regeneración y en algunos casos con formación tipo neuroma. Hubo aumento de vasos sanguíneos de menos de 40 micras en la periferia del injerto y alguna célula sanguínea cerca de estos frentes regenerativos. También hubo imágenes de licuefacción de la grasa en la periferia del injerto venoso. Estructuralmente se identificó la presencia de la estructura de fibrina en el interior del injerto nervioso (Ilustración 19).

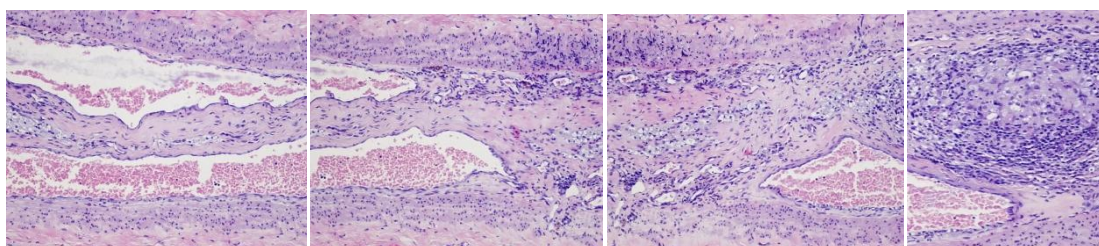


Ilustración 19. Especimen Grupo II subgrupo 21 días

A los 80 días se produjo la degeneración completa de ambos cabos por el fracaso en la regeneración nerviosa.

4.3.1.3 Grupo III

En los ejemplares de 7 días se comprobó la presencia de los extremos nerviosos dentro del injerto venoso, en ambos extremos se constató la presencia de degeneración Walleriana. Se observó inflamación epineural asociada a la sutura, con fibroblastos inmaduros y sin polimorfonucleares. Se visualizó congestión vascular muy prominente en vénulas de 40 y 100 micras no dependientes del endotelio y localizadas en las zonas más distales del extremo proximal nervioso. Pudo observarse proliferación de histiocitos con algunas células gigantes asociados tanto al material de sutura como a la lesión del tejido adiposo por acción de la lipasa.

A nivel del nervio el perineuro se mantuvo intacto y con zonas de neoperineuro en formación que se visualizó como un aumento de las mitosis de un epitelio especializado. En las zonas de degeneración Walleriana se produjo su desaparición y mostró un punto de contacto con el endotelio venoso. A partir de ese punto es el propio endotelio quien asume la función de perineuro. Se visualizó mínimo tejido colágeno inmaduro. En toda la preparación se observaron acúmulos de mielina y células de Schwann con una marcada hipertrofia de los núcleos e hiperplasia que se objetivó en forma de vacuolas grandes que ocupan prácticamente todo el citoplasma y llenas de lípidos. No se objetivó reacción inflamatoria endoneural (Ilustración 20).

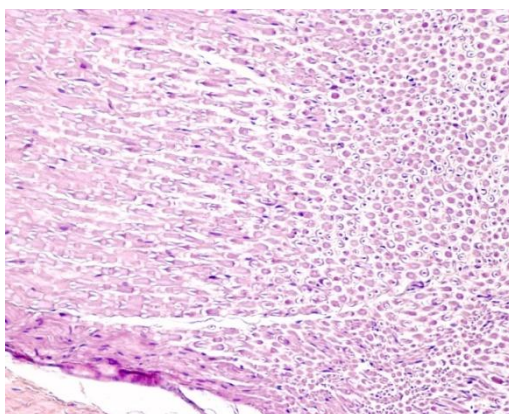


Ilustración 20. Especimen Grupo III subgrupo 7 días

A los 21 días pudo comprobarse la presencia de fascículos nerviosos bien estructurados y con independencia, que se prolongaban en el injerto venoso. En

la zona proximal, al igual que en los ejemplares de 7 días, hubo fusión entre el perineuro y el endotelio que pudo observarse en distintos puntos a lo largo de la regeneración nerviosa. No se visualizaron neuromas ni tejido cicatricial. No hubo actividad inflamatoria. En algunos especímenes se encontraron fascículos nerviosos en regeneración a poca distancia del extremo distal (Ilustración 21).

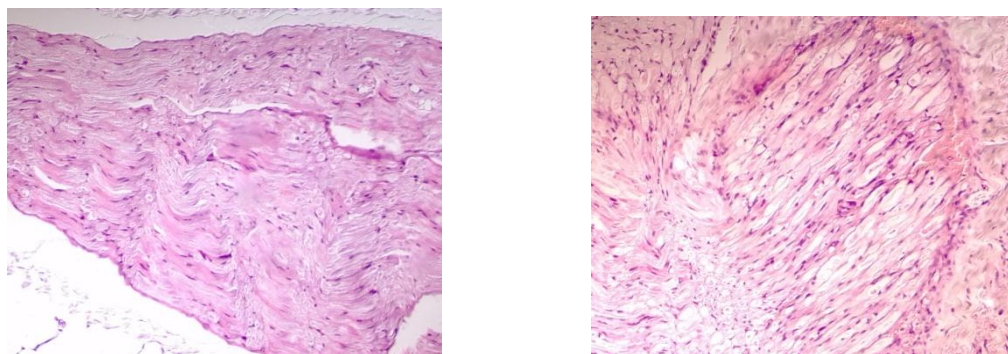


Ilustración 21. Especimen Grupo III subgrupo 21 días

A los 80 días se observaron estructuras nerviosas con presencia completa de los componentes, pero de calibres menores.

4.3.2 Detección de Neurofilamentos

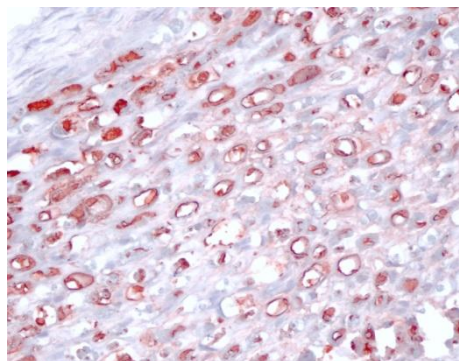
Los neurofilamentos son los elementos estructurales principales de las neuronas y sus procesos comprenden una triada de proteínas de pesos moleculares aproximados de 70, 160 y 200 kD.

Se realizó la detección de células positivas a neurofilamentos mediante el uso del anticuerpo monoclonal “mouse anti-human neurofilament”, clon 2F11 (anti-NF, 2F11). El anti-NF, 2F11 reaccionó con la forma fosforilada del componente de 70 kD de las tres unidades principales de los polipéptidos de neurofilamentos.

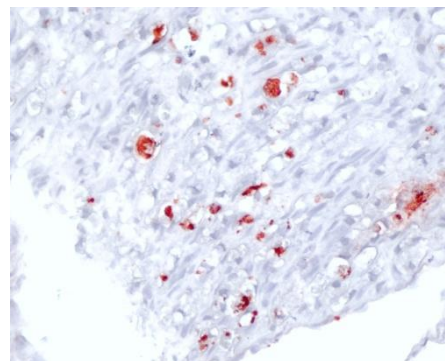
4.3.2.1 Grupo I

Se observó positividad de neurofilamentos proximal marcada en todas las muestras analizadas, 23 en total (Ilustración 22 y 24). En las ilustraciones 23 y 25 se puede observar un positivo débil en el extremo distal seguramente debido a la degeneración parcial de los neurofilamentos.

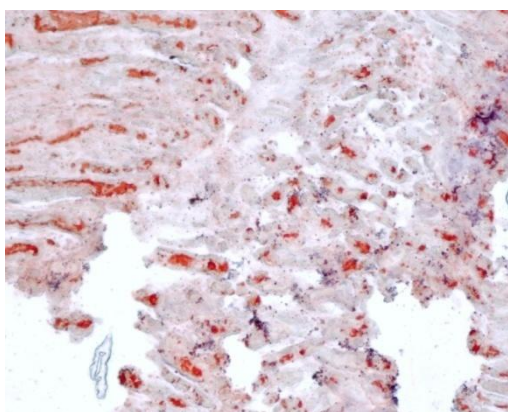
Ambas ilustraciones son un ejemplo representativo de las muestras analizadas.



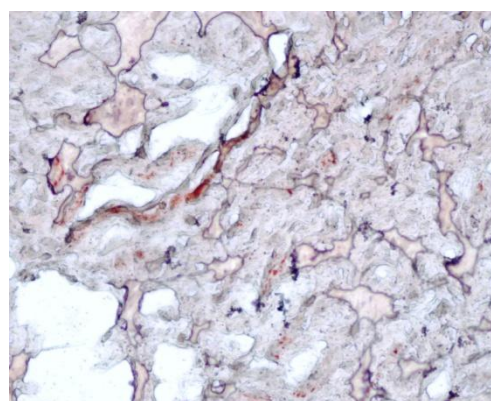
*Ilustración 22. Especimen Grupo I 7 días
extremo proximal*



*Ilustración 23. Especimen Grupo I 7 días
extremo distal*



*Ilustración 24. Especimen Grupo I 21 días
extremo proximal*



*Ilustración 25. Especimen Grupo I 21 días
extremo distal*

4.3.2.2 Grupo II

Se observó positividad de neurofilamentos proximal marcada en todas las muestras analizadas, en un total de 23, a día 7 (Ilustración 26), día 21 (Ilustración 27) y a día 80 (Ilustración 29) del grupo II. En las Ilustraciones 27 y 28 se puede observar un positivo débil en el extremo distal a día 21 y día 80.

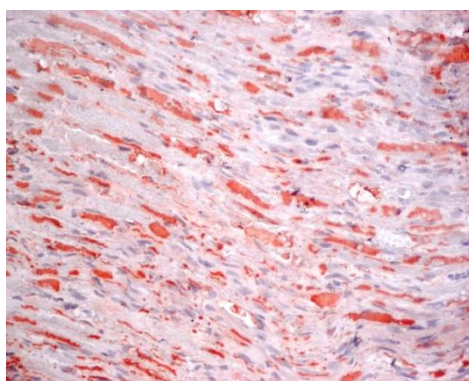
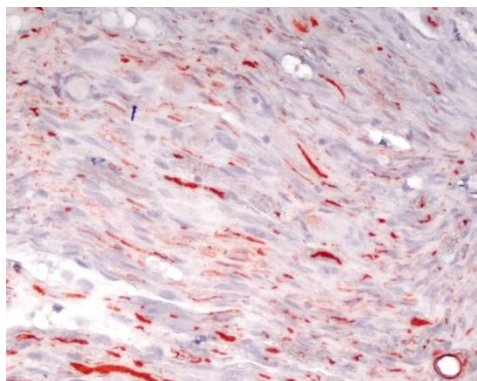
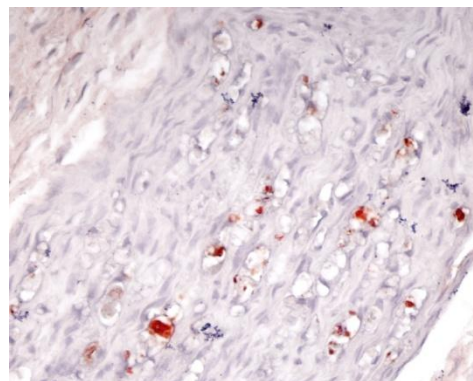


Ilustración 26. Especimen grupo II 7 días



*Ilustración 27. Especimen Grupo II 21 días
extremo proximal*



*Ilustración 28. Especimen Grupo II 21 días
extremo distal*

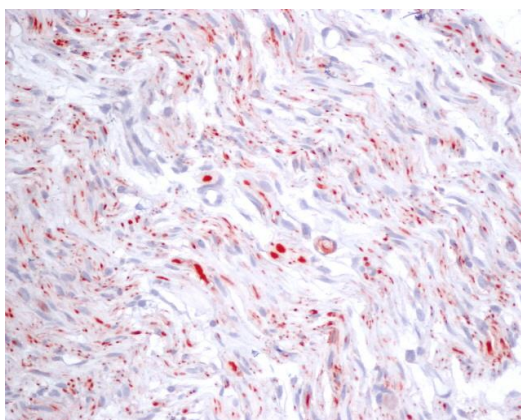


Ilustración 29. Especimen Grupo II 80 días extremo proximal

4.3.2.3 Grupo III

Se observó positividad de neurofilamentos proximal marcada en todas las muestras analizadas del grupo III, en un total de 26, a día 7, día 21 y día 80. En la Ilustración 30 se reflejan los resultados de positividad de neurofilamentos a día 21.). En la Ilustración 31 se puede observar un positivo débil en el extremo distal a día 21, y los mismos resultados se observaron a día 7 y día 80. En la ilustración 32 podemos constatar microscópicamente la estructura nerviosa fundamental.

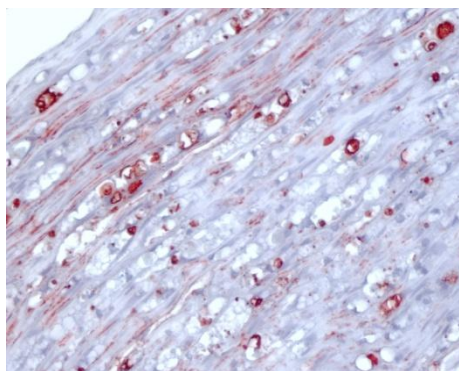


Ilustración 30. Especimen Grupo III 21 días extremo proximal

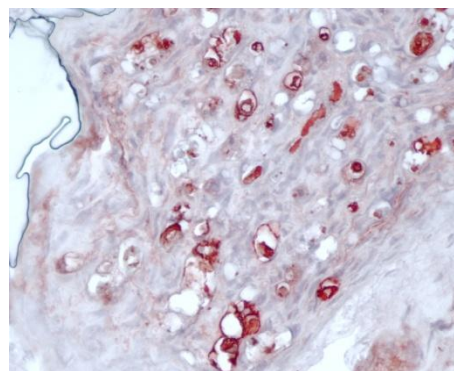


Ilustración 31. Especimen Grupo III 21 días extremo distal

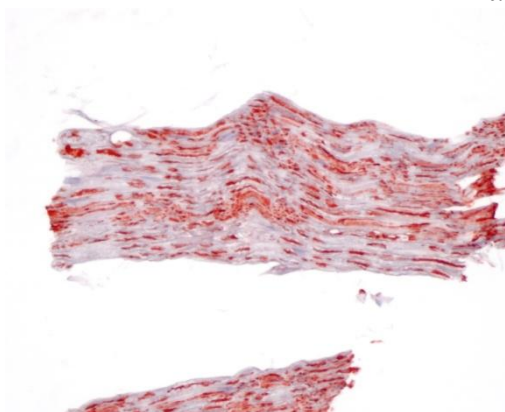


Ilustración 32. Especimen Grupo III 80 días

4.3.3 Detección del factor de crecimiento endotelial (VEGF)

El estudio se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, clone JH 121 ("mouse monoclonal Ig G") de la casa comercial Millipore.

4.3.3.1 Grupo I

En la zona de regeneración, se detectó a día 7 la presencia de positividad frente a los anticuerpos de VEGF a nivel de los axones de la zona proximal y especialmente intenso en la zona de regeneración. También se observó dicha positividad en los fascículos que estaban generando un neuroma en la zona periférica de distribución del nervio (Ilustración 33).

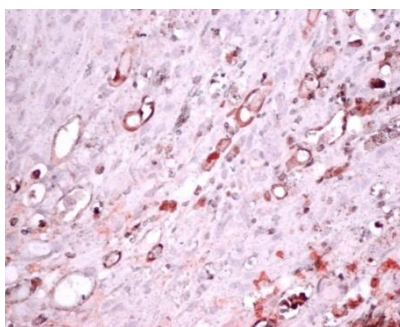


Ilustración 33. Especimen Grupo I 7 días

La positividad frente a anti-VEGF en los casos de 21 días se mantuvo en un número alto de axones y su presencia pudo detectarse longitudinalmente. Se observaron neurovesículas en los neurotúbulos que justificaron el transporte desde el soma neuronal (Ilustración 34).

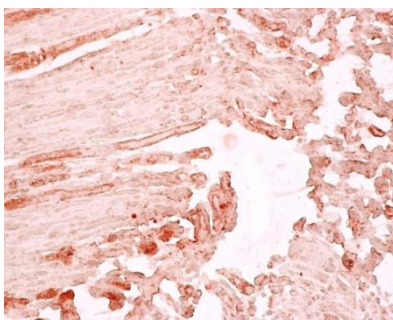


Ilustración 34. Especimen Grupo I 21 días

4.3.3.2 Grupo II

La expresión de VEGF se constató en el extremo proximal asociado a filamentos nerviosos en regeneración a los 7 días del tratamiento (Ilustración 35).

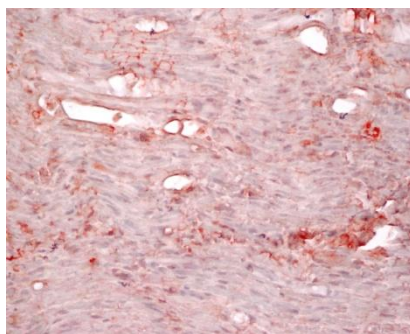


Ilustración 35. Especimen Grupo II 7 días

Se mantuvo la positividad frente al VEGF en los fascículos que mantenían la regeneración y existía positividad en brotes capilares que se localizaban en la zona periférica y dependientes del endotelio venoso (Ilustración 36 A y B).

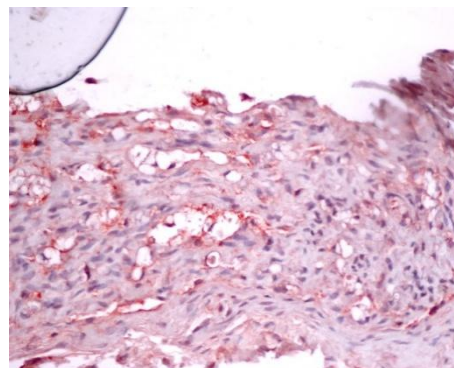
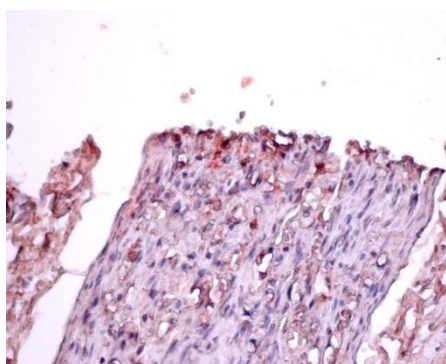


Ilustración 36 A y B . Especimen Grupo II 21 días extremo proximal (A), extremo distal (B)

4.3.3.3 Grupo III

Se observó positividad frente al VEGF tanto en el extremo proximal como en el distal localizándose en gránulos de transporte. También se pudieron ver gránulos en vesículas en las células de Schwann (Ilustración 37).

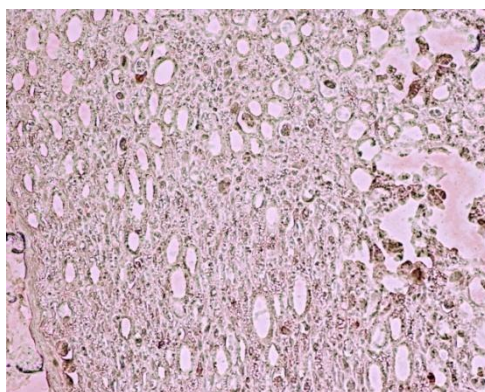


Ilustración 37. Especimen Grupo III 7 días VEGF

Extremo proximal

En el grupo de 21 días se constató positividad tanto en el extremo proximal como distal a nivel de estructuras de neurotúbulos que existían en ambos extremos. También se observó positividad en el citoplasma de las células de Schwann tanto a nivel distal como proximal (Ilustraciones 38 y 39, respectivamente).

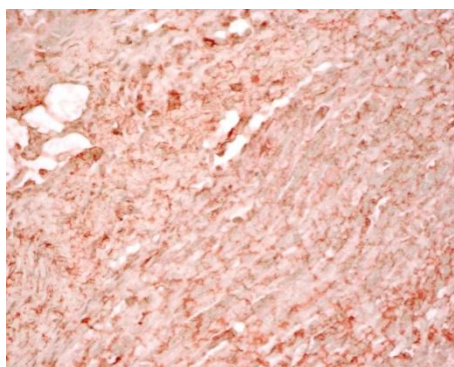


Ilustración 38. Especimen Grupo III 21 días VEGF

Extremo proximal

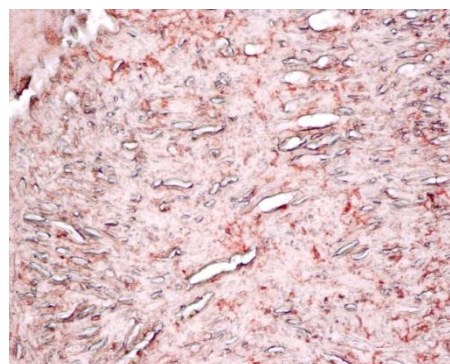


Ilustración 39. Especimen Grupo III 21 días VEGF

Extremo distal

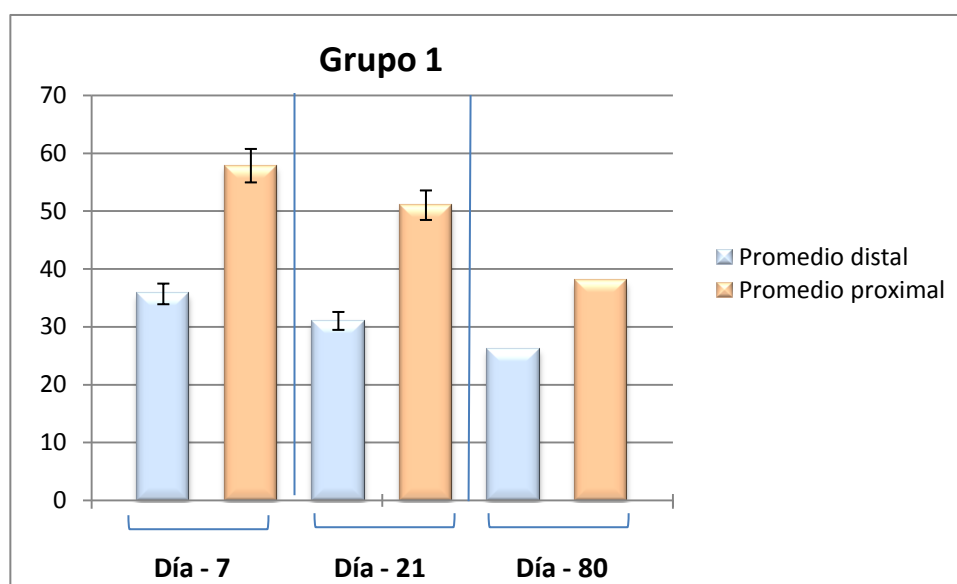
4.4 Valoración técnica de Estadística

Los resultados que se exponen a continuación presentan la comparación de los promedios por grupos. Estableciendo las diferencias entre proximal y distal en cada grupo.

En la Ilustración 40 se observa que el número de axones que se contabilizan se reduce entre el lado distal y proximal en los tres grupos de estudio, aunque las diferencias no fueron significativas. Para determinar estos datos se realizaron mediciones bajo el microscopio óptico de las distintas preparaciones. Manteniendo el microscopio en 20 aumentos se contabilizaron los positivos a las técnicas de tinción con anticuerpos en cuatro campos de 40 micras cada uno, tanto en el extremo distal como proximal.

Se han contabilizado un total de 90 preparaciones a ocho campos entre las imágenes proximales y distales.

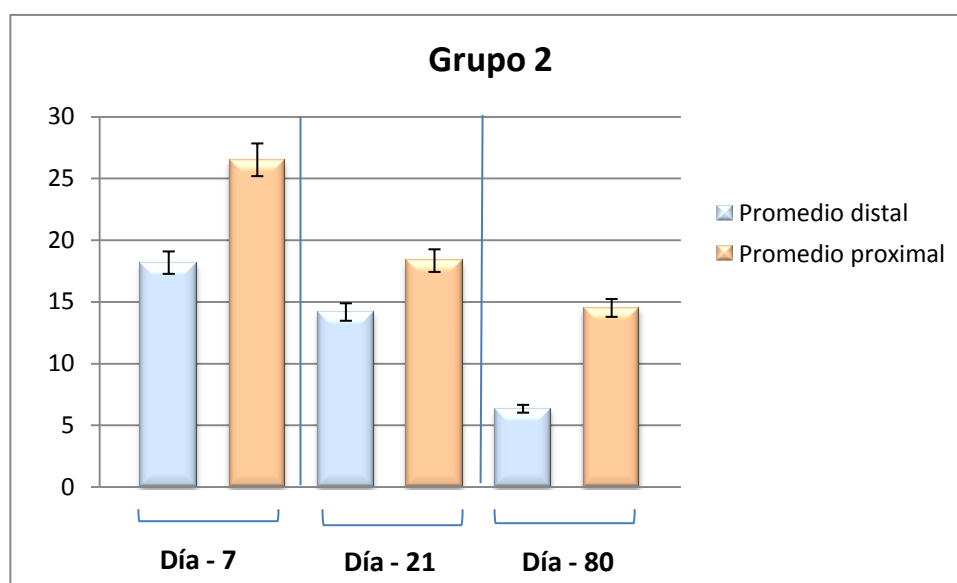
Ilustración 40. Resultados de promedios distales en el Grupo 1



Eje abcisas: Media de axones contabilizados

En los tres grupos se puede observar un descenso notable en el número de axones correspondientes al cabo distal que fue significativo entre el tratamiento a día 7 y 21 ($p=$) entre el tratamiento a día 7 y 80 ($p=$) y entre el tratamiento a día 21 y 80 ($p=$) (Ilustración 41).

Ilustración 41. Resultados de los promedios distales y proximales en los especímenes del Grupo 2

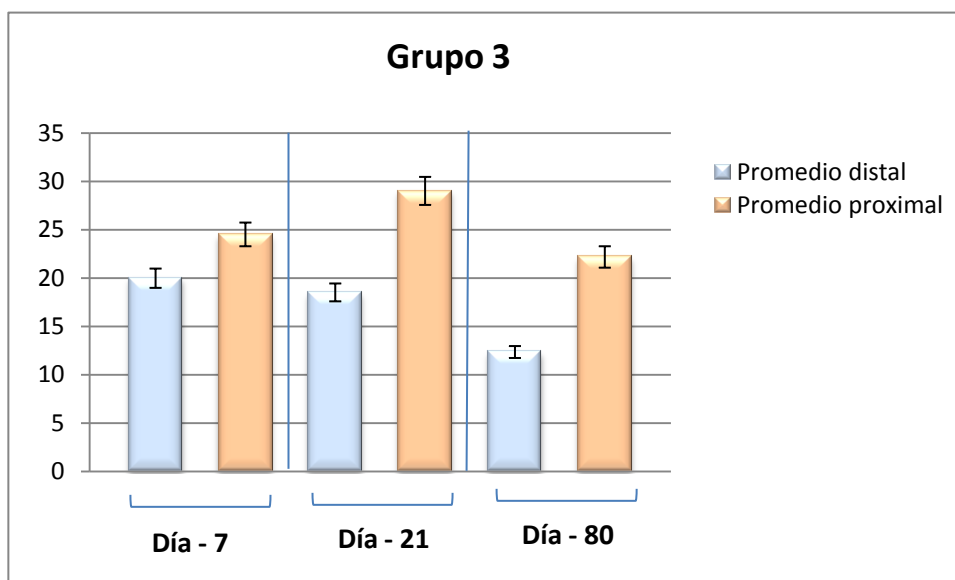


Eje abscisas: Media de axones contabilizados

En esta figura podemos observar el mismo descenso en el número de axones regenerados pero a diferencia del caso anterior podemos constatar un menor descenso en el número de ellos. Manteniendo una tasa de regeneración superior.

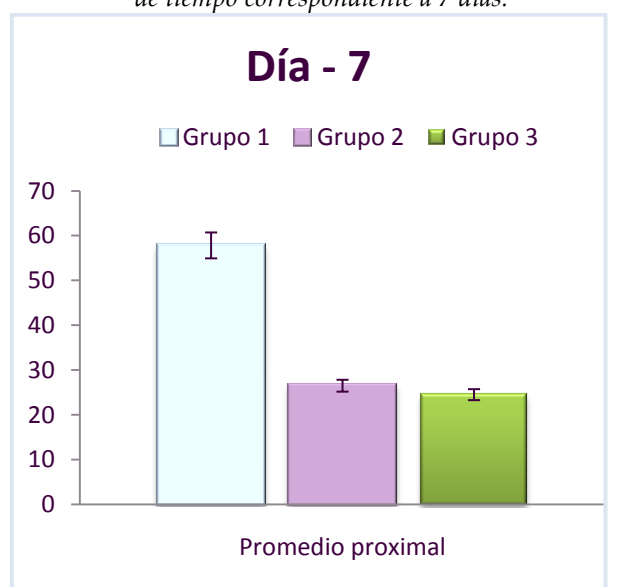
En la parte correspondiente a discusión se exponen las diferentes causas de esta distinta valoración.

Ilustración 42. Resultados correspondientes al Grupo 3



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

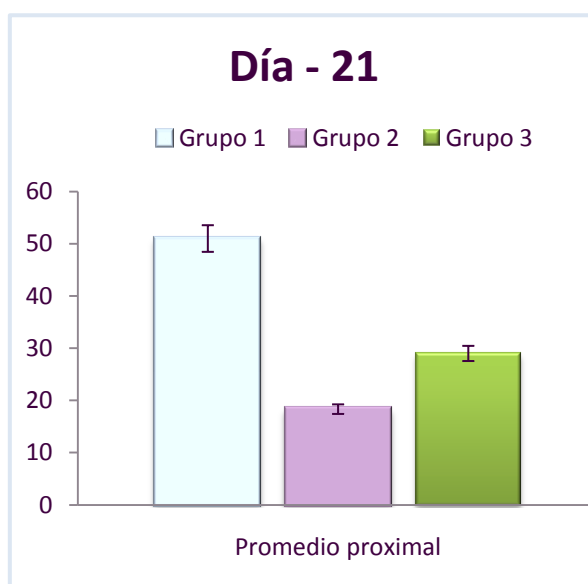
Ilustración 43. Resultados comparativos entre los promedios proximales de los tres grupos en el intervalo de tiempo correspondiente a 7 días.



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

En esta figura podemos contabilizar el número de axones que mantienen la viabilidad y que por tanto mantienen su potencial regenerador.

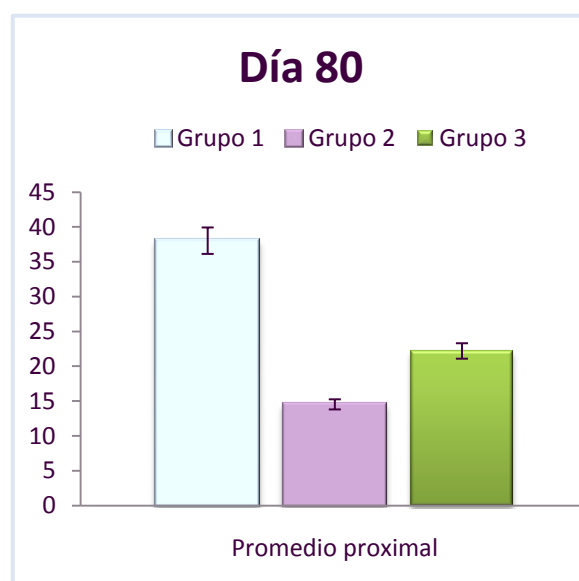
Ilustración 44. Resultados comparativos entre los promedios distales de los tres grupos en el intervalo de tiempo correspondiente a 21 días.



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

En esta figura observamos la situación de la viabilidad de los axones en el momento temporal correspondiente a 21 días. Se puede observar un descenso en el número de axones viables respecto al número inicial a los 7 días. Este descenso es más marcado en el grupo 2 y es menos marcado en el grupo 1.

Ilustración 45. Resultados comparativos de los promedios proximales correspondientes al intervalo de 80 días.



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

En las siguientes ilustraciones se aportan los resultados correspondientes a la permanencia de proteínas neurales en los extremos distales y por lo tanto la posibilidad de mantenimiento de citoesqueleto para la regeneración.

Ilustración 46. Resultado de los promedios distales correspondientes al intervalo de 7 días.



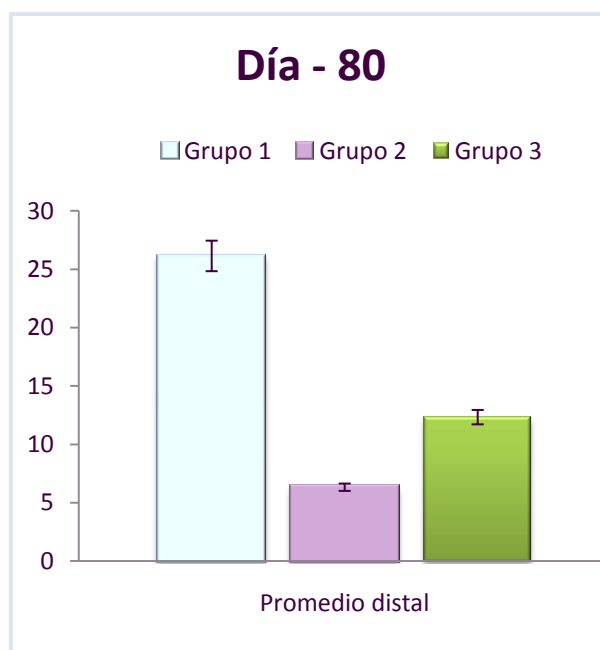
Eje abscisas: Media de axones contabilizados

Ilustración 47. Resultados de los promedios distales correspondientes al intervalo de 21 días.



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

Ilustración 48. Resultados de los promedios distales correspondientes al intervalo de 80 días.



Eje abscisas: Media de axones contabilizados

Discusión

5 DISCUSIÓN

Los avances de la microcirugía han dotado a los cirujanos de herramientas necesarias para la reparación nerviosa periférica. El tratamiento clínico implica múltiples aspectos que influyen en la regeneración, desde una neurorrafia básica con alineación correcta de fascículos o el uso de injertos microquirúrgicos vascularizados para cubrir soluciones de continuidad amplias. El éxito de la regeneración suele ser muy variable y la recuperación funcional rara vez es completa. Además en las intervenciones en que se asocia el empleo de injertos nerviosos hay que valorar la morbilidad de la zona donante.

No es muy probable que los avances en la regeneración nerviosa se deriven de nuevas técnicas de sutura microquirúrgica nerviosa. Sin embargo mediante el conocimiento y la aplicación de los múltiples aspectos farmacológicos, biológicos y genéticos se podrían conseguir perspectivas nuevas que activen los resultados en la regeneración nerviosa. Los estudios realizados en neurociencia combinados con los cultivos celulares, técnicas genéticas y desarrollo de nuevos biomateriales parecen crear una ola de optimismo que mejorará el resultado del tratamiento de las lesiones periféricas ⁵⁸.

La ingeniería tisular une los esfuerzos de médicos, ingenieros y biólogos para conseguir un dispositivo, sintético o biológico, que se establezca como canal guía para los brotes axonales, que permita la difusión de factores neurotróficos y neurotróficos y que minimice la infiltración por tejido fibroso. Debe asimismo asociar una amplia disponibilidad, facilidad de uso y que no implique el sacrificio de otras zonas donantes.

Actualmente son múltiples los frentes y las combinaciones para crear el dispositivo de regeneración nerviosa ideal.

El empleo de materiales biológicos como el pilar principal para la creación del dispositivo, tiene un planteamiento básico y con una evolución en el tiempo que ha sido la base para crear futuras comparaciones ¹¹⁰⁻¹¹². Los modelos iniciales de regeneración nerviosa interponían las estructuras venosas entre ambos extremos nerviosos de modo que se creaba la atmósfera de factores neurotróficos y neurotróficos necesarios para la regeneración. Dicha opción regeneradora tiene una contrapartida importante que es la distancia máxima en la que existe un impulso regenerador factible. En los estudios se ha determinado que dicha distancia es de tres centímetros.¹¹¹ En soluciones de

continuidad superiores no existe una interacción correcta entre los factores promotores de la regeneración creados desde el extremo proximal y distal de los cabos nerviosos y los receptores que se sitúan en las células.

Los materiales biológicos más compatibles desde el punto de vista funcional son los injertos nerviosos decelularizados, procedente de cadáver, y los músculos acelulares. Ambas opciones tienen en común la presencia de un componente interno que representa el esqueleto endoneurial de los nervios ^{60, 113-115} y que se integra como la base para el avance de las células de Schwann en su formación de las bandas de Bügner y como base también para la regeneración axonal. Sin embargo presentan una contrapartida técnica que es la presencia de restos celulares. Estos restos celulares activan los procesos de respuesta inflamatoria o incluso de respuesta injerto contra huésped. A pesar de este problema técnico, los resultados de la literatura son positivos en las regeneraciones con injerto nervioso criopreservados ¹¹⁶⁻¹¹⁹ y algo menos en el caso de músculos acelulares .

La aplicación de moduladores inmunogénicos parece favorecer la regeneración y el crecimiento axonal. El empleo de FK506 a dosis bajas crea un cambio en la reacción inmune frente a los restos celulares de los transplantes y genera un componente positivo para la regeneración del tejido ¹²⁰⁻¹²¹.

En la propia literatura aparecen ejemplos de combinaciones de los distintos dispositivos biológicos como el componente del músculo acelular preservado por la vena ¹²², en él se puede observar cómo las células de Schwann conectan con la lámina basal del músculo y migran a través de ella y cómo forman envueltas perineurales.

Los dispositivos de materiales biodegradables son otra opción que favorece la regeneración nerviosa, incluso los derivados del ácido polilactico-poliglicólico se encuentran en pleno uso en el mercado. Las propiedades físicas como la porosidad, la textura de la superficie interior e indirectamente sus características eléctricas tienen una influencia muy eficaz incrementando la tasa de regeneración ⁵⁸.

La implicación de las células de soporte es básica en la regeneración. Aunque no está claro su mecanismo último, las células de Schwann se apoyan en un sustrato para la migración del axón y posteriormente segregan las sustancias neurotróficas ¹²⁰. Las células de Schwann cumplen un doble papel, acción

paracrina sobre los axones y una acción física entre el cono de crecimiento, y suplen, en un aspecto físico, la falta de membrana endoneural.

Otras opciones celulares alternativas han barajado extirpes celulares como fibroblastos, células del bulbo olfatorio o incluso células madre. La obtención de los fibroblastos, así como su manejo en laboratorio, tanto para su multiplicación como para su transfección, los hacen unas células atractivas para su empleo en la regeneración. Filogenéticamente son muy cercanos a la célula de Schwann, de hecho cuando esta célula transforma su morfología, en los momentos regenerativos, este parecido se pone de manifiesto. Son fácilmente transfectadas por vectores víricos llegando a tasas del 99%.

Las alternativas también han buscado células tipo HEK-293, originarias del riñón ¹²³, que son transfectadas con factor nervioso de crecimiento e *in vitro* mantiene actividad hasta los 9 días.

Las alternativas últimas aún en estudio corresponden a las células pluripotenciales y a las células madre. Su máxima virtud es su capacidad de diferenciación hacia una estirpe celular determinada. Las células pluripotenciales del hipocampo fetal dispuestas en un medio de colágeno se diferencian hacia las extirpes celulares nerviosas, tanto del sistema nervioso central como periférico, y mantienen su potencial regenerador en la familias de células de Schwann ¹²⁴.

Frente a la literatura en la que encontramos descripciones de fibrosis generadas por la actividad local de fibroblastos^{48, 125}, en nuestro estudio no hemos podido determinar una interferencia directa de los fibroblastos sobre la aparición de fibrosis. En el grupo I el comportamiento regenerativo coincide con el descrito en artículos previos y de hecho se obtiene regeneración nerviosa que conecta ambos extremos nerviosos y que prosigue en la longitud del nervio en base a la secuencia temporal. En el grupo II se describe un impulso regenerativo que no consigue culminar el proceso, pero si analizamos las variables, este fallo de regeneración sería atribuible a la distancia entre extremos nerviosos superior a 3 centímetros^{7, 126-127}, de hecho se pueden observar escasos fascículos que intentan conectar con el extremo distal. Sin embargo en el grupo III la presencia de fibroblastos no parece mostrar interacción negativa en el proceso regenerador y de hecho frente al grupo II presenta muchos fascículos con actividad regeneradora positiva e interconexión de ambos extremos nerviosos.

En el Grupo I subgrupo 7 días, se observa la presencia de células de cuerpo extraño rodeando el material de sutura que interfiere con la regeneración de fibras nerviosas de su proximidad. Dado que el material de sutura está dispuesto de forma periférica no observamos dicha distorsión en las zonas centrales de la preparación y se pueden constatar la presencia de macrófagos en dicha periferia.

En los casos correspondientes a los animales del grupo II, vena con fibrina, los resultados cambian en los tres subgrupos temporales. A los 7 días podemos observar la presencia de degeneración Walleriana en ambos extremos, alteración en la morfología de las células de Schwann y su migración hacia la formación de las bandas de Bügner. No se observa reacción de cuerpo extraño por la disposición anatómica del espécimen, ya que los extremos nerviosos, tanto proximal como distal, han sido introducidos en el interior de la vena y los puntos de sutura se disponen entre la pared del vaso y el epineuro, sin afectar a los fascículos nerviosos. No se puede identificar una presencia importante de macrófagos.

En el subgrupo de 21 días se obtienen resultados en los que se observa regeneración nerviosa guiada, alternando con fascículos que han generado un neuroma. Entre los primeros observamos la disposición longitudinal de las células de Schwann hasta los conos de crecimiento y distal a estos se ven las fibras de fibrina y la presencia de fibroblastos que han migrado desde el tejido circundante atravesando la pared venosa. La zona correspondiente a vena se ve en la preparación como un endotelio, mínima capa elástica y adventicia, que a veces incluye conglomerados grasos.

En ambos grupos no hay distorsión de las estructuras anatómicas, no hay destrucción de tejidos sino la degeneración nerviosa que equivale a cada secuencia temporal y la existencia de un vaso sanguíneo que en el subgrupo de 80 días, grupo II se encuentra colapsado¹²⁸⁻¹²⁹.

La ausencia de macrófagos en el grupo II evita la presentación de las proteínas estructurales endoneurales como antígeno activando la reacción inmune tipo IV¹³⁰⁻¹³¹.

En el grupo III, correspondiente a los fibroblastos transducidos con VEGF con lecho de fibrina e introducidos en la vena, se observan diferencias significativas.

En el subgrupo de 7 días podemos describir la presencia de varios componentes diferentes a lo que esperamos respecto a la fisiopatología. Existe degeneración Walleriana en ambos extremos, se objetivan los ovillos de mielina alrededor de los restos axonales y las células de Schwann se pueden ver con hiperplasia e hipertrofia.

No se objetiva la presencia de neuroma ni de fibrosis aunque el número de fibroblastos es similar al de otros grupos. Dichas células son inmaduras y no se objetiva la presencia de cicatriz.

También podemos observar la presencia de múltiples vénulas con aspecto congestivo y diámetros superiores a 40 micras y 100 micras que se encuentran en el extremo proximal y en posición cercana al cono de regeneración, aunque en la mayoría de los casos también se observan retrógradamente en el interior del nervio, disminuyendo su número en dirección proximal al soma. La presencia de estos componentes vasculares no se ha podido objetivar en los grupos anteriores y conecta directamente con publicaciones en la literatura referentes a la acción angiogénica del factor de crecimiento endotelial^{15, 132}.

La existencia de microvascularización intraneural asegura la supervivencia de las neuronas y aumenta la capacidad regenerativa. El factor de crecimiento endotelial guiaría directamente la migración de los progenitores neurales y aunque estas células presentan expresión de los dos receptores del VEGF, la activación de VEGFr2 parece ser la responsable del efecto de quimiotaxis de los conos de crecimiento^{82, 133}. El VEGF parece mostrarse como un activador de la migración de las células neuronales indiferenciadas y es el mecanismo que une angiogénesis y neurogénesis¹³³.

En la literatura también encontramos otra expresión clínica de la acción del factor de crecimiento endotelial y su posible actividad diferenciadora de los paquetes vasculonerviosos en la embriología. Así en las últimas publicaciones parece presentar la quimioatracción básica no sólo de los progenitores vasculares sino también de los neurales incluyendo tanto células neuronales como gliales¹³⁴.

La presencia de fibroblastos transfectados con VEGF genera una organización fascicular que permite una regeneración ordenada frente a lo que se puede observar con los injertos venosos en los cuales hay una regeneración escasa.

Podríamos comparar los resultados con los descritos con los injertos acelulares de músculo con implantes de células de Schwann ⁶⁴. En estos casos la lámina basal muscular actúa como estructura soporte para la regeneración axonal y es apoyada por las células de Schwann. En nuestro caso la fibrina sería el soporte y la regeneración axonal estaría reforzada por la presencia de VEGF actuando en diferentes niveles:

- vascular, favoreciendo la presencia de vénulas que apoyan la nutrición en toda la longitud del canal guía.
- neurotrófico, por su acción sobre la glía periférica generando su hiperplasia.
- neurotrópico, uniéndose a receptores axonales y del núcleo de la neurita que potencian su progresión.

Los análisis histológicos confirman la presencia de nuevos fascículos mielinados en el grupo III, frente a lo que se ha observado en los resultados de la comparativa con el grupo II. Este resultado coincide con lo publicado por Zhang que aplicó la introducción de células de Schwann a los injertos venoso y los presentó como una alternativa al injerto venoso puro ¹³⁵.

La presencia de vénulas, a nivel microscópico, y de vasos sanguíneos peri-injerto venoso, a nivel macroscópico, tiene dos niveles de acción. Por una vertiente evita la presencia de la cicatriz ¹³⁶ como se puede observar en la literatura y a la vez permite la difusión de nutrientes de forma más activa, ante esta situación del microambiente molecular hemos añadido la presencia de fibrina intraluminal que permite mantener sin colapso la luz de la vena y apoyar el crecimiento del cono axonal.

En el ambiente a nivel molecular se podría analizar el papel que desempeña la presencia de óxido nítrico y la activación de la cascada de prostaglandinas y leucotrienos que actúan como agentes quimiotácticos de macrófagos y de células responsables de cicatrización y fibrosis. Este último dato no lo hemos analizado en esta Memoria, sino que lo que hemos observado es la activación de la regeneración nerviosa frente a lo que aparece en la literatura.

La presencia positiva del aumento del componente vascular para la regeneración nerviosa está avalado por estudios en el sistema nervioso central ¹³⁷, en ellos se demuestra que en situaciones de fallo vascular la aplicación de

fármacos como la eritropoyetina, elevan los niveles locales de VEGF y BDNF, lo que se traduce en un aumento de la angiogénesis y neurogénesis, e incrementa el grado de recuperación funcional.

Por otro aspecto, los estudios indican una conexión entre la embriogénesis del sistema nervioso periférico y el patrón vascular. Los factores que generan crecimiento y guía de los paquetes vasculonerviosos parecen dirigidos desde el componente neural pero basándose en la actuación paracrina del VEGF. Se ha asociado la regeneración conjunta de microvasos y axones mediante la acción integral del factor que permite el crecimiento de microvasos para la posterior supervivencia neural y regeneración ¹³⁸.

Diversos estudios realizados *in vitro* explican el mecanismo de acción de factor VEGF a nivel neuronal y de la célula de Schwann ^{100, 82-83, 139-140}. Mediante estos estudios el VEGF actúa mediado por el receptor flk-1 que se encuentra en las neuronas y células de Schwann, y tiene una acción autocrina y paracrina. A nivel de estas últimas hemos observado un cambio importante tanto en la morfología como en la funcionalidad ⁸⁴.

Estos hallazgos apoyarían la elección del factor VEGF como uno de los factores de crecimiento importantes para la regeneración nerviosa por los dos efectos directos que genera sobre la neovascularización y su acción morfológica y funcional sobre la célula de Schwann.

Es posible que la transducción del fibroblasto y la sobreexpresión de VEGF localmente generen aumento de la síntesis local de NGF que actúe como retroactivo del crecimiento axonal mediante un aumento en el número de conos axonales.

Entre nuestros resultados podemos comprobar cómo se observa positividad inmunohistoquímica en las fibras nerviosas que están en proceso activo de regeneración. Sondell plantea la existencia de transporte axonal retrógrado hacia el núcleo que coincide con la positividad frente al factor de crecimiento endotelial en la longitud de los axones¹⁰⁰. Y podríamos superponer dicha positividad a la que obtenemos con la detección de neurofilamentos. Entre nuestros resultados no hemos podido obtener positividad a un factor y negatividad a otro por lo que podríamos deducir que la activación del soma neuronal produce proteínas neuroestructurales y el propio factor de crecimiento endotelial con expresión autocrina y paracrina.

En el grupo I obtenemos la doble positividad tanto a proteínas estructurales como a factor de crecimiento endotelial, pero no en todos los axones, por lo que se podría implicar la desaparición axonal retrógrada y la muerte celular en estos casos. En cambio en el grupo III el porcentaje de positividad en ambas técnicas de inmunohistoquímica es mayor, con datos cercanos al 100% de las células lesionadas. Este dato se confirma con la característica de neuroprotección que se atribuye al factor de crecimiento endotelial¹⁴¹⁻¹⁴².

La presencia del componente venoso en la regeneración nerviosa establece una barrera biológica que permite mantener la reología de la zona respecto a las citocinas de acción autocrina y paracrina y la creación de los brotes axonales; pero a la vez se establece como una barrera que impide el contacto con células tipo neutrófilos y especialmente macrófagos que actúan como mediadores de la cascada de la inflamación y como inicio de la fibrosis cicatricial. Cuando aparece el componente de fibrosis se produce la atenuación del impulso de regeneración y esta es la principal causa de los fallos de reparación nerviosa.¹⁴³. En nuestro estudio podemos observar la poca presencia de células espumosas o de cuerpo extraño en los casos en los que hemos utilizado la cubierta venosa.

Así mismo la presencia de fibrina no se ha comportado como una dificultad ante la regeneración nerviosa sino que ha aportado una vía de avance de los conos regenerativos. Las formaciones de tipo neuroma se han podido observar más claramente en los especímenes de sutura directa por la acción directa del material de sutura, zonas que a su vez tenían la población de macrófagos más aumentada y que generaban zonas de fibrosis.

En nuestros datos también hemos intentado controlar farmacológicamente otras dos variables como son la infección y la inflamación. Siguiendo la pauta de la práctica clínica, nuestros animales tuvieron administraciones de antibioterapia durante una semana con una dosis intravenosa preoperatoria.

También introducimos la toma de ácido acetilsalicílico a diario durante 1 mes para controlar el proceso inflamatorio e inhibir la activación de la cicloxigenasa evitando la cascada inflamatoria y el aumento local de factores inhibidores de la regeneración¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

En las comparativas entre grupos podemos observar cómo se establece la degeneración walleriana en todos los casos. El número de axones que se contabilizan entre el lado distal y proximal se reduce en los tres grupos.

En los tres grupos se puede observar un descenso notable en el número de axones correspondientes al cabo distal que se hace más patente en las determinaciones a más largo plazo.

En el grupo 1 y 2 el descenso es correlativo en el tiempo mientras que en el grupo 3 se puede observar un aumento en el número de axones a los 21 días. Este hecho se podría explicar por la acción neuroprotectora del factor de crecimiento endotelial pero a su vez aporta una característica de este factor como es la acción neurogeneradora. En la literatura se ha podido demostrar que la supresión del factor endotelial reduce la densidad de los gránulos en el citoplasma celular y genera menos conexiones dendríticas y más cortas.^{146 147.}

También hemos podido constatar que la pervivencia en el tiempo de los axones regenerados es mayor consiguiendo una mayor tasa de regeneración efectiva. La causa última de esta acción no está totalmente establecida en la literatura. La acción del factor endotelial se puede poner de manifiesto tanto en neuronas jóvenes como en neuronas adultas aunque en estas parece disminuir el efecto¹⁴⁸ y tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Pero la vía final intrínseca de la cascada molecular no está descrita.

En esta Memoria hemos observado una acción de vasculogénesis que se manifiesta en el grupo 3. El origen de dicha actividad creemos intrínseco a la acción principal del factor, pero en nuestros especímenes nunca la vasculogénesis ha interferido con la neurogénesis aunque físicamente el proceso neurorregenerativo está contenido en una vena. Establecemos en este punto la posibilidad de una acción reguladora por parte de la células de Schwann respecto a los niveles paracrinós en el microambiente celular. Dicho efecto puede verse también en los procesos proliferativos en los cuales se produce una desregulación de los niveles de factor vascular endotelial¹⁴⁹.

En el análisis de los datos de los tres grupos por intervalos de tiempo podemos observar cómo la cercanía de ambos conos proximal y distal aumenta la supervivencia axonal y permite mantener un número mayor de axones que regeneran el extremo distal.

También podemos constatar la supervivencia en el tiempo de los especímenes tratados con el factor endotelial. Este dato se manifiesta específicamente en la comparativa entre los grupos 2 y 3 de conejos, en los promedios distales.

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

1. El dispositivo elegido como canal guía permite el desarrollo axonal en su longitud creando un ambiente celular adecuado y activo para la regeneración nerviosa.
2. La presencia del factor de crecimiento endotelial genera un microambiente que potencia tanto la supervivencia como la regeneración neuronal. Produce activación en las dos estirpes celulares principales de los nervios periféricos.
3. Los hallazgos morfológicos derivados del factor de crecimiento endotelial se considera que son la base para la activación de la regeneración nerviosa tanto en el sistema nervioso central como periférico.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Waller AV. On the nutrition and reparation of nerves. *Proc R Institution.* 1862;3:378.
2. Millesi H. Reappraisal of nerve repair. *Surg Clin North Am.* 1981(61):321-40.
3. Taylor GI, Ham FJ. The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1976 Apr;57(4):413-26.
4. Townsend PL, Taylor GI. Vascularised nerve grafts using composite arterialised neuro-venous systems. *Br J Plast Surg.* 1984 Jan;37(1):1-17.
5. Seddon HJ. The surgery of nerve injuries. *Practitioner.* 1960 Feb;184:181-7.
6. Sunderland S. Anatomical features of nerve trunks in relation to nerve injury and nerve repair. *Clin Neurosurg.* 1970;17:38-62.
7. Mackinnon SE. Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.* 1989 Jul;16(3):587-603.
8. Luo L, O'Leary, D.D. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:127-56.
9. (Waller A. Experiments on the sections of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc Lond* 140, 423–429) 1850;140:423-9.
10. Sunderland S. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle Nerve.* 1990 Sep;13(9):771-84.
11. Waller AV. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos Trans R Soc Lond.* 1850;140:423.
12. Chumasov EI, Svetikova KM. Structure and nature of macrophages participating in the wallerian degeneration of nerve fibers. *Neurosci Behav Physiol.* 1992 Sep-Oct;22(5):408-14.
13. Be'eri H, Reichert F, Saada A, Rotshenker S. The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *Eur J Neurosci.* 1998 Aug;10(8):2707-13.
14. Marcinkiewicz M, Marcinkiewicz J, Chen A, Leclaire F, Chretien M, Richardson P. Nerve growth factor and proprotein convertases furin and PC7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in Schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells. *J Comp Neurol.* 1999 Jan 25;403(4):471-85.
15. Hobson MI, Green CJ, Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat.* 2000 Nov;197(Pt 4):591-605.
16. Liu RY, Snider WD. Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J Neurosci.* 2001 Sep 1;21(17):RC164.

17. Creange A, Barlovatz-Meimon G, Gherardi RK. Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw.* 1997 Jun;8(2):145-51.
18. Taskinen HS, Roytta M. Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1alpha, RANTES) after peripheral nerve transection. *J Peripher Nerv Syst.* 2000 Jun;5(2):75-81.
19. Rhodes KE, Raivich G, Fawcett JW. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines. *Neuroscience.* 2006;140(1):87-100. Epub 2006 Apr 21.
20. Finkelstein DI, Luff AR, Schuijers JA. Immunity to nerve growth factor and the effect on motor unit reinnervation in the rabbit. *Am J Physiol.* 1992 May;262(5 Pt 2):R813-8.
21. Brushart TM. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci.* 1988 Mar;8(3):1026-31.
22. Terzis JK, Dykes RW. Reinnervation of glabrous skin in baboons: properties of cutaneous mechanoreceptors subsequent to nerve transection. *J Neurophysiol.* 1980 Dec;44(6):1214-25.
23. (Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:889-98.
24. (Zhai Q, Wang, J., Kim, A., Liu, Q., Watts, R., Hoopfer, E., Mitchison, T., Luo, L. H, Z. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration. *Neuron.* 2003:217-25.
25. Zhang M, Chen J, Luo L, Xiao Q, Sun M, Liu Z. Altered corneal nerves in aqueous tear deficiency viewed by in vivo confocal microscopy. *Cornea.* 2005 Oct;24(7):818-24.
26. Howard MJ, David, G., et al. Resealing of transected myelinated mammalian axons in vivo: evidence for involvement of calpain. *Neuroscience.* 1999;93(2):807-15.
27. Friede RL, Bischhausen R. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. *J Neurol Sci.* 1980 Jan;44(2-3):181-203.
28. Tetzlaff W. Tight junction contact events and temporary gap junctions in the sciatic nerve fibres of the chicken during Wallerian degeneration and subsequent regeneration. *J Neurocytol.* 1982 Oct;11(5):839-58.
29. Nachemson AK, Hansson HA, Dahl D, Lundborg G. Visualization of regenerating sciatic nerve fibres by neurofilament immunohistochemistry. *Acta Physiol Scand.* 1986 Apr;126(4):485-9.
30. Anselin AD, Davey DF. Axonal regeneration through peripheral nerve grafts: the effect of proximo-distal orientation. *Microsurgery.* 1988;9(2):103-13.
31. Shibuya Y, Mizoguchi A, Takeichi M, Shimada K, Ide C. Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the chicken peripheral nervous system. *Neuroscience.* 1995 Jul;67(1):253-61.
32. Spira ME, Oren, R., et al. Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *J Comp Neurol* 2003;457(3):293-312.
33. Ebadi M, Bashir, R.M., et al., 1997. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.* 30 (4-5), 347-374. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int.* 1997;30(4-5):347-74.

34. Ikegami R. [Changes of nerve growth factor (NGF) content in injured peripheral nerve during regeneration: local synthesis of NGF by Schwann cells]. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1990 Jul;64(7):612-22.
35. Althaus HH, Kloppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett*. 1992 Feb 3;135(2):219-23.
36. Chen ZL, Yu, W.M., et al. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:209-33.
37. Ren XR, Ming, G.L., et al. Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nat Neurosci*. 2004;7(11):1204-12.
38. Low K, Culbertson, M., et al., 2008. Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. *J. Neurosci*. 28 (5), 1099–1108. Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. . *J Neurosci*. 2008;28(5):1099-108.
39. Spinelli ED, McPhail, L.T., et al. Class A plexin expression in axotomized rubrospinal and facial motoneurons. *Neuroscience*. 2007;144(1266-1277).
40. Wang GY, Hirai K, Shimada H. The role of laminin, a component of Schwann cell basal lamina, in rat sciatic nerve regeneration within antiserum-treated nerve grafts. *Brain Res*. 1992 Jan 20;570(1-2):116-25.
41. Ahmed Z, Brown RA. Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1999;42(4):331-43.
42. Salonen V, Peltonen J, Roytta M, Virtanen I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J Neurocytol*. 1987 Oct;16(5):713-20.
43. David S, Braun PE, Jackson DL, Kottis V, McKerracher L. Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J Neurosci Res*. 1995 Nov 1;42(4):594-602.
44. Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol*. 2003 Nov 24;163(4):889-99.
45. Becker CM, Gueuning CO, Graff GL. Sutures of fibrin glue for divided rat nerves. Schwann cell and muscle metabolism. *J Reconstr Microsurg*. 1984 Oct;1(2):139-45.
46. Zhou S. [Anastomosis of peripheral nerves by fibrin glue. An experimental study]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 1990 Nov;28(11):689-92, 704.
47. Chen HH, Liu HM. The use of collagen polymer tube and fibrin clot in peripheral nerve repair. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*. 1994 Apr;18(2):58-63.
48. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante RL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg*. 2006 Feb;22(2):123-8.
49. Doherty P, Dickson JG, Flanigan TP, Leon A, Toffano G, Walsh FS. Molecular specificity of ganglioside effects on neurite regeneration of sensory neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 1985 Dec 4;62(2):193-8.
50. Wang MS, Chen ZW, Zhang GJ, Chen ZR. Topical GM1 ganglioside to promote crushed rat sciatic nerve regeneration. *Microsurgery*. 1995;16(8):542-6.

51. Lehmann HC, Lopez PH, Zhang G, Ngyuen T, Zhang J, Kieseier BC, et al. Passive immunization with anti-ganglioside antibodies directly inhibits axon regeneration in an animal model. *J Neurosci*. 2007 Jan 3;27(1):27-34.
52. Rutkowski JL, Tennekoon GI, McGillicuddy JE. Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. *Ann Neurol*. 1992 Jun;31(6):580-6.
53. Salyapongese AN, Billiar TR, Edington H. Gene therapy and tissue engineering. *Clinics in Plastic Surgery*. October 1999;26(4):663-76.
54. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1995;16(2):65-70.
55. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Jones DS, Seckel BR. Inside-out vein graft promotes improved nerve regeneration in rats. *Microsurgery*. 1993;14(9):608-18.
56. Brushart TM, Seiler WD. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*. 1987 Aug;97(2):289-300.
57. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. *Microsurgery*. 1999;19(6):275-80.
58. Hudson TW, Evans GRD, Shmidt CE. Engineering strategies for Peripheral nerve repair. *Clinics in Plastic Surgery*. 1999;26(4):617-28.
59. Calteux N, Bins Ely J, Schoofs M, de Coninck A. [Use of a vein segment in peripheral nerve repair]. *Ann Chir Main*. 1984;3(2):149-55.
60. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W. Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Feb;107(2):485-94; discussion 95-6.
61. Ide C, Tohyama K, Tajima K, Endoh K, Sano K, Tamura M, et al. Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol*. 1998 Nov;154(1):99-112.
62. Best TJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino A, Evans PJ. Verification of a free vascularized nerve graft model in the rat with application to the peripheral nerve allograft. *Plast Reconstr Surg*. 1993 Sep;92(3):516-25.
63. Evans PJ, Mackinnon SE, Levi AD, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, et al. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve*. 1998 Nov;21(11):1507-22.
64. Fansa H, Keilhoff G. Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):167-73.
65. Strasberg SR, Watanabe O, Mackinnon SE, Tarasidis G, Hertl MC, Wells MR. Wire mesh as a post-operative physiotherapy assistive device following peripheral nerve graft repair in the rat. *J Peripher Nerv Syst*. 1996;1(1):73-6.
66. Chamberlain LJ, Yannas IV, Arrizabalaga A, Hsu HP, Norregaard TV, Spector M. Early peripheral nerve healing in collagen and silicone tube implants: myofibroblasts and the cellular response. *Biomaterials*. 1998 Aug;19(15):1393-403.

67. Plant GW, Harvey AR, Chirila TV. Axonal growth within poly (2-hydroxyethyl methacrylate) sponges infiltrated with Schwann cells and implanted into the lesioned rat optic tract. *Brain Res.* 1995 Feb 6;671(1):119-30.
68. Lee DY, Choi BH, Park JH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, et al. Nerve regeneration with the use of a poly(l-lactide-co-glycolic acid)-coated collagen tube filled with collagen gel. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006 Jan;34(1):50-6 Epub 2005 Dec 15.
69. Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. *J Comp Neurol.* 1983 Aug 20;218(4):460-70.
70. Cheng B, Chen Z. Fabricating autologous tissue to engineer artificial nerve. *Microsurgery.* 2002;22(4):133-7.
71. Cheng L, Esch FS, Marchionni MA, Mudge AW. Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol Cell Neurosci.* 1998 Oct;12(3):141-56.
72. Nyilas E, Chiu TH, Sidman RL, Henry EW, Brushart TM, Dikkes P, et al. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1983;29:307-13.
73. Siironen J, Vuorio E, Sandberg M, Roytta M. Expression of type I and III collagen and laminin beta1 after rat sciatic nerve crush injury. *J Peripher Nerv Syst.* 1996;1(3):209-21.
74. Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):4160-5 Epub 2001 Mar 20.
75. Anand P, Terenghi G, Birch R, Wellmer A, Cedarbaum JM, Lindsay RM, et al. Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury. *Neuroreport.* 1997 May 27;8(8):1935-8.
76. Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci.* 2000 Dec;12(12):4171-80.
77. Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1995 Aug;134(2):261-72.
78. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Nakano H, Li YJ, et al. A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. *Brain Res.* 2001 Jul 13;907(1-2):1-19.
79. Rabinovsky ED. The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. *Neurol Res.* 2004 Mar;26(2):204-10.
80. Cheng HL, Randolph A, Yee D, Delafontaine P, Tennekoon G, Feldman EL. Characterization of insulin-like growth factor-I and its receptor and binding proteins in transected nerves and cultured Schwann cells. *J Neurochem.* 1996 Feb;66(2):525-36.
81. Davis JB, Stroobant P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol.* 1990 Apr;110(4):1353-60.
82. Schwarz Q, Gu C, Fujisawa H, Sabelko K, Gertsenstein M, Nagy A, et al. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with

- Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev.* 2004 Nov 15;18(22):2822-34.
83. Sondell M, Kanje M. Postnatal expression of VEGF and its receptor flk-1 in peripheral ganglia. *Neuroreport.* 2001 Jan 22;12(1):105-8.
 84. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Res.* 1999 Nov 6;846(2):219-28.
 85. Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Mar;40(3):760-6.
 86. Lee DA, Zurawel RH, Windebank AJ. Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. *J Neurochem.* 1995 Aug;65(2):564-8.
 87. Rabinovsky ED, Smith GM, Browder DP, Shine HD, McManaman JL. Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res.* 1992 Jan;31(1):188-92.
 88. Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *J Peripher Nerv Syst.* 2005 Mar;10(1):17-30.
 89. Gulati AK. Immune response and neurotrophic factor interactions in peripheral nerve transplants. *Acta Haematol.* 1998;99(3):171-4.
 90. Rotshenker S, Aamar S, Barak V. Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve. *J Neuroimmunol.* 1992 Jul;39(1-2):75-80.
 91. Sjöberg J, Kanje M. Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res.* 1989 Apr 17;485(1):102-8.
 92. Kayton RJ, Aktas RG. Electron microscopic immunolocalization of basic fibroblast growth factor in peripheral nerves. *Histochem Cell Biol.* 2000 Nov;114(5):413-9.
 93. Pataky DM, Borisoff JF, Fernandes KJ, Tetzlaff W, Steeves JD. Fibroblast growth factor treatment produces differential effects on survival and neurite outgrowth from identified bulbospinal neurons in vitro. *Exp Neurol.* 2000 Jun;163(2):357-72.
 94. Monfils MH, Driscoll I, Kamitakahara H, Wilson B, Flynn C, Teskey GC, et al. FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury. *Eur J Neurosci.* 2006 Aug;24(3):739-49.
 95. Santos FX, Bilbao G, Rodrigo J, Fernandez J, Martinez D, Mayoral E, et al. Experimental model for local administration of nerve growth factor in microsurgical nerve reconnections. *Microsurgery.* 1995;16(2):71-6.
 96. Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G. Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg [Br].* 1996 Aug;21(4):514-22.
 97. Bampton ET, Taylor JS. Effects of Schwann cell secreted factors on PC12 cell neuritogenesis and survival. *J Neurobiol.* 2005 Apr;63(1):29-48.
 98. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol.* 2000;11:617 - 24.

99. ZG. Zhang; L. Zhang QJ, R. Zhang, K. Davies, C. Powers, N. Bruggen, M. Chopp. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000;106:829-38.
100. Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci*. 2000 Dec;12(12):4243-54.
101. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19(14):5731-40.
102. Meirer R, Gurunluoglu R, Siemionow M. Neurogenic perspective on vascular endothelial growth factor: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2001 Nov;17(8):625-30.
103. Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol*. 2004;187(2):246-53.
104. Mukoyama YS, Gerber HP, Ferrara N, Gu C, Anderson DJ. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development*. 2005 Mar;132(5):941-52 Epub 2005 Jan 26.
105. Gupta R, Gray M, Chao T, Bear D, Modafferi E, Mozaffar T. Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve compression injury. *Muscle Nerve*. 2005 Apr;31(4):452-60.
106. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals*. 2005;14(5):207-21.
107. Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J, Ny A, Wyns S, Tammela T, et al. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci*. 2006 Mar;9(3):340-8 Epub 2006 Feb 5.
108. Park HJ, Kim MN, Kim JG, Bae YH, Bae MK, Wee HJ, et al. Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(9):1462-72. Epub 2007 May 21.
109. Lasso JM DRM, García M, Martínez Calleja V, Nava P, Muñoz-Fernández MA, Pérez Cano R. Improving flap survival by transplantation of a VEGF-secreting endothelialised scaffold during distal pedicle flap creation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(3):279-86.
110. Rice DH, Berstein FD. The use of autogenous vein for nerve grafting. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1984 Aug;92(4):410-2.
111. Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llena J. Determining the maximal length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. 1996 November;12(8):521-7.
112. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. *Clin Plast Surg*. 2005 Oct;32(4):605-16, viii.
113. Fansa H, Schneider W, Wolf G, Keilhoff G. Host responses after acellular muscle basal lamina allografting used as a matrix for tissue engineered nerve grafts1. *Transplantation*. 2002 Aug 15;74(3):381-7.

114. Liu XL, Arai T, Sondell M, Lundborg G, Kanje M, Dahlin LB. Use of chemically extracted muscle grafts to repair extended nerve defects in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2001 Dec;35(4):337-45.
115. Di Benedetto G, Zura G, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Bertani A. Nerve regeneration through a combined autologous conduit (vein plus acellular muscle grafts). *Biomaterials*. 1998 Jan-Feb;19(1-3):173-81.
116. Accioli-De-Vaconcellos ZA, Kassar-Duchossoy L, Mira JC. Long term evaluation of experimental median nerve repair by frozen and fresh nerve autografts, allografts and allografts repopulated by autologous Schwann cells. *Restor Neurol Neurosci*. 1999;15(1):17-24.
117. Rutkowski GE, Heath CA. Development of a bioartificial nerve graft. I. Design based on a reaction-diffusion model. *Biotechnol Prog*. 2002 Mar-Apr;18(2):362-72.
118. Rutkowski GE, Heath CA. Development of a bioartificial nerve graft. II. Nerve regeneration in vitro. *Biotechnol Prog*. 2002 Mar-Apr;18(2):373-9.
119. Fansa H, Lassner F, Kook PH, Keilhoff G, Schneider W. Cryopreservation of peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*. 2000 Aug;23(8):1227-33.
120. Sobol JB, Lowe IJ, Yang RK, Sen SK, Hunter DA, Mackinnon SE. Effects of delaying FK506 administration on neuroregeneration in a rodent model. *J Reconstr Microsurg*. 2003 Feb;19(2):113-8.
121. Myckatyn TM, Mackinnon SE, Hunter DA, Brakefield D, Parsadanian A. A novel model for the study of peripheral-nerve regeneration following common nerve injury paradigms. *J Reconstr Microsurg*. 2004 Oct;20(7):533-44.
122. Raimondo S, Nicolino S, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Perroteau I, et al. Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. *J Comp Neurol*. 2005 Aug 22;489(2):249-59.
123. Jimenez JC, Tyson DR, Dhar S, Nguyen T, Hamai Y, Bradshaw RA, et al. Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells): characterization and dose-response relationship for modulated release of nerve growth factor for nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Feb;113(2):605-10.
124. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, et al. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*. 2003 Jun 6;974(1-2):17-24.
125. Herter T, Schleep J, Windmann D. [Do fibrin glue sleeves produce fibrosis in transplanted nerves?]. *Neurochirurgia (Stuttg)*. 1989 Jan;32(1):16-20.
126. Shibib K, Brock M, Muller H, Gosztanyi G. Maximal regeneration distance. How far can a peripheral axon regenerate? *Neurol Res*. 1985 Dec;7(4):177-81.
127. Suematsu N, Atsuta Y, Hirayama T. Vein graft for repair of peripheral nerve gap. *J Reconstr Microsurg*. 1988 Jul;4(4):313-8.
128. Choi BH, Zhu SJ, Kim SH, Kim BY, Huh JH, Lee SH, et al. Nerve repair using a vein graft filled with collagen gel. *J Reconstr Microsurg*. 2005 May;21(4):267-72.
129. Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg*. 1995 Jan;11(1):21-6.
130. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg*. 1989 Mar;22(3):257-73.

131. Chumasov EI, Svetikova KM. [The structure and nature of the macrophages participating in Wallerian degeneration of nerve fibers]. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1991 May;100(5):13-21.
132. Hobson MI. Increased vascularisation enhances axonal regeneration within an acellular nerve conduit. *Ann R Coll Surg Engl.* 2002 Jan;84(1):47-53.
133. Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol.* 2003 Dec 22;163(6):1375-84.
134. Weinstein B. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell.* 2005;3(120):299-302.
135. Zhang F, Blain B, Beck J, Zhang J, Chen Z, Chen ZW, et al. Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg.* 2002 May;18(4):295-300.
136. Tang JB, Shi D, Zhou H. Vein conduits for repair of nerves with a prolonged gap or in unfavourable conditions: an analysis of three failed cases. *Microsurgery.* 1995;16(3):133-7.
137. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke.* 2004 Jul;35(7):1732-7 Epub 2004 Jun 3.
138. Bearden SE, Segal SS. Microvessels promote motor nerve survival and regeneration through local VEGF release following ectopic reattachment. *Microcirculation.* 2004 Dec;11(8):633-44.
139. Scarlato M, Ara J, Bannerman P, Scherer S, Pleasure D. Induction of neuropilins-1 and -2 and their ligands, *Sema3A*, *Sema3F*, and VEGF, during Wallerian degeneration in the peripheral nervous system. *Exp Neurol.* 2003 Oct;183(2):489-98.
140. Yang K, Cepko CL. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6089-99.
141. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1843-51.
142. Namiecinska M, Marciniak K, Nowak JZ. [VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor]. *Postepy Hig Med Dosw.* 2005;59:573-83.
143. Herter T. Problems of fibrin adhesion of the nerves. *Neurosurg Rev.* 1988;11(3-4):249-58.
144. Camara-Lemarroy CR, Guzman-de la Garza FJ, Barrera-Oranday EA, Cabello-Garcia AJ, Garcia-Tamez A, Fernandez-Garza NE. Celecoxib accelerates functional recovery after sciatic nerve crush in the rat. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2008;3:25.
145. Kowara R, Moraleja KL, Chakravarthy B. PLA(2) signaling is involved in calpain-mediated degradation of synaptic dihydropyrimidinase-like 3 protein in response to NMDA excitotoxicity. *Neurosci Lett.* 2008 Jan 17;430(3):197-202.
146. Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 Jan 13.



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría

147. Licht T, Eavri R, Goshen I, Shlomai Y, Mizrahi A, Keshet E. VEGF is required for dendritogenesis of newly born olfactory bulb interneurons. *Development*. 2010 Jan;137(2):261-71.
148. Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnuki K, Mizunoya W, Mukuda T, et al. Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. *J Neurosci*. 2008 Dec 31;28(53):14522-36.
149. Oka N, Soeda A, Inagaki A, Onodera M, Maruyama H, Hara A, et al. VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 31;360(3):553-9.



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría